

# **Radikal-induzierte Störungen der NO<sup>•</sup>-Signaltransduktion bei endothelialer Dysfunktion**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Martina Weber**

aus Essen

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

PD Dr. rer. nat. Georg Kojda

Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Dieter Höltje

Tag der mündlichen Prüfung

09. Dezember 2002

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/>

# **1 INHALTSVERZEICHNIS**

---

1	INHALTSVERZEICHNIS .....	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	8
3	EINLEITUNG .....	13
3.1	Der NO <sup>•</sup> /cGMP-Signaltransduktionsweg .....	14
3.2	Die endotheliale NO-Synthase .....	16
3.3	Die lösliche Guanylatzyklase .....	20
3.4	Endotheliale Dysfunktion.....	23
3.5	Fragestellung.....	25
4	MATERIAL UND METHODEN .....	27
4.1	Substanzen und Puffer.....	28
4.2	Versuchstiere.....	33
4.2.1	Ratten.....	33
4.2.2	Kaninchen.....	34
4.2.3	Bestimmung der NO <sup>•</sup> -Freisetzung mit der Iso-NO-Elektrode .....	34
4.2.4	Quantitative Bestimmung von Peroxynitrit mit Dihydrorhodamin 123 .....	37
4.3	Inkubationen .....	40
4.3.1	SPER/NO.....	40
4.3.2	Xanthin/Xanthinoxidase .....	40
4.3.3	SPER/NO und Xanthin/Xanthinoxidase.....	40
4.3.4	SPER/NO und Lumazin/Xanthinoxidase .....	41
4.3.5	LY 83583 .....	41
4.4	Proteinbestimmung .....	42
4.5	Zellkultur .....	43
4.5.1	Verwendete Zellkulturen und Medien.....	43
4.5.2	Transfektionen.....	44
4.6	Biochemische Untersuchungen .....	48

4.6.1	Enzymisolierung und Aufreinigung .....	48
4.6.2	Enzymaktivitätsbestimmungen.....	49
4.6.3	Western Blot.....	52
4.6.4	Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen (ESR).....	55
4.7	Molekularbiologische Untersuchungen .....	61
4.7.1	Präparation und Analyse von DNA .....	61
4.7.2	Plasmid-DNA Isolierung und Aufreinigung.....	62
4.8	DNA-Mikroinjektion.....	72
4.9	Statistik .....	73
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>74</b>
5.1	Untersuchungen zum Mechanismus der endothelialen Dysfunktion am Beispiel der Hypertonie .....	75
5.1.1	Auswirkungen der Hypertonie auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase ..	75
5.1.2	Auswirkungen der Hypertonie auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase.....	77
5.2	Untersuchungen zum Einfluss von Radikalen auf die Aktivität und Expression löslicher Guanylatzyklase.....	78
5.2.1	Einfluss extrazellulärer Superoxidradikale auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase.....	78
5.2.2	Einfluss von extrazellulärem Peroxynitrit auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase.....	80
5.2.3	Einfluss von NO• auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase.....	83
5.2.4	Einfluss intrazellulärer Superoxidradikale auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase .....	84
5.3	Auswirkungen der Atherosklerose auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase .....	87
5.4	Mutation und Entkopplung der endothelialen NO-Synthase .....	90
5.4.1	Herstellung des C101A-eNOS-Plasmides.....	91

5.4.2	Sequenzierung der mutierten eNOS .....	95
5.4.3	Expression der eNOS in Sf 9 Zellen.....	96
5.4.4	Expression der eNOS in 293 HEK-Zellen.....	100
5.4.5	Untersuchungen der eNOS-Aktivität in WT- und MT-HEK Zellen in Abhängigkeit von BH <sub>4</sub> .....	103
5.4.6	Messung von Superoxidradikalen in WT- und MT-HEK Zellen.....	104
5.4.7	Messung der NO <sup>•</sup> -Produktion in WT- und MT-Zellen .....	108
5.4.8	Überprüfung der Modifikationen von Proteinen in transfizierten HEK Zellen..	110
5.4.9	Aufreinigung der WT- und C101A-eNOS aus den HEK Zellen.....	112
5.4.10	Messung der spezifischen Aktivität gereinigter WT- und C101A-eNOS .....	113
5.4.11	Überprüfung der Dimerisierung gereinigter WT- und C101A-eNOS.....	114
5.5	Herstellung des eNOS-Tie-2-Promotor-Plasmides .....	117
5.5.1	Veränderungen des Tie-2-Promotors.....	117
5.5.2	Veränderung des eNOS-Plasmides.....	120
5.5.3	Ligation der eNOS-cDNA in POK II .....	122
5.6	Genotypisierung der TgN(Tie2eNOS)GK .....	125
6	DISKUSSION .....	126
6.1	Mechanismus der endothelialen Dysfunktion bei Hypertonie .....	127
6.2	Schädigung des vaskulären NO <sup>•</sup> /cGMP-Signaltransduktionsweges durch reaktive Sauerstoffverbindungen .....	129
6.2.1	Einfluss von extrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die Aktivität und Expression der sGC .....	130
6.2.2	Einfluss von intrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die Aktivität und Expression der sGC .....	133
6.3	Veränderungen des vaskulären NO <sup>•</sup> /cGMP-Signaltransduktionsweges bei Atherosklerose.....	135
6.4	Die endotheliale NO-Synthase als Quelle reaktiver Sauerstoffverbindungen.....	138

6.5 Die Etablierung eines transgenen Tiermodells mit endothelspezifischer Überexpression der eNOS .....	148
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>151</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>154</b>
<b>9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>168</b>
<b>10 DANKSAGUNG.....</b>	<b>171</b>
<b>11 LEBENSLAUF.....</b>	<b>172</b>

## **2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

---

AcNPV	Nukleärer Polyhedrosis Virus von <i>Autographa californica</i>
ADP	Adenosindiphosphat
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CMH	1-Hydroxy-3-carboxy-5-methyl-pyrrolidin
ddNTPs	Didesoxynukleotide
DETC	Diethyldithiocarbamat
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DNP-Hydrazone	2,4-Dinitrophenylhydrazone
dNTPs	Desoxynukleotide
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DTPA	Diethylentriamin-pentaessigsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N'N'- tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase

EPDA	End-Point-Dilution-Assay
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fötale Rinderserum
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid= Riboflavin-5'-monophosphat
G 418-Sulfat	Geneticin-Sulfat, Antibiotikum, C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
His	Histidin
Hsp90	Hitzeschock-Protein 90
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRAG	IP <sub>3</sub> Rezeptor assoziiertes cGMP (G)-Kinase Substrat
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Vollmedium
LDL	Low-density-lipoprotein
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Argininmethylester
LY 83583	6-Anilinochinolin-5,8-chinon
MT	Mutante
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NGF	Nerve-growth-factor
pbl2SK+	Bluescript Vektor
PBS	Phosphatpuffer
pcDNA3	Vektor zur Transfektion in HEK Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

PK	Tie 2 Promotor Konstrukt
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethansulfonfluorid
POK I	Promotor-Oligo-Konstrukt I
POK II	Promotor-Oligo-Konstrukt II
PP IX	Protoporphyrin IX
pVL 1393	Vektor zur Transfektion in Sf 9 Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Sarkoplasmatische-Retikulum-ATPasen
Sf 9	Insektenzellen aus den Ovarien des „Fall armyworm“ <i>Spodoptera frugiperda</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SHR15	15 Monate alte spontanhypertensive Ratten
SNAP	racem. S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
SPER/NO	(4-[1-(3-Aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino]butyl)- 1,3-propandiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Natriumchlorid-Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TgN(Tie2eNOS)GK	Transgener Tierstamm mit dem Tie-2-eNOS-Plasmid
TNM-FH	komplettes Insektenzellmedium mit FBS und Gentamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WIS15	15 Monate alte normotensive Ratten
WT	Wildtyp
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase
YC-1	3'-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol

## **3 EINLEITUNG**

---

### 3.1 Der NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweg

Eine Voraussetzung für die Funktionalität des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges ist die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) durch die NO-Synthasen. Gebildetes NO<sup>•</sup> kann frei durch Membranen diffundieren und wirkt als endogener Botenstoff auf verschiedene Weise protektiv (Abb. 1). Die am besten bekannte Wirkung ist die Vasodilatation (122), NO<sup>•</sup> wirkt aber auch antiaggregatorisch in Thrombozyten (142) und antiadhäsiv in Leukozyten (86). Ebenfalls werden dem NO<sup>•</sup> antiproliferative (160) und antioxidative Effekte zugeschrieben (5;144).

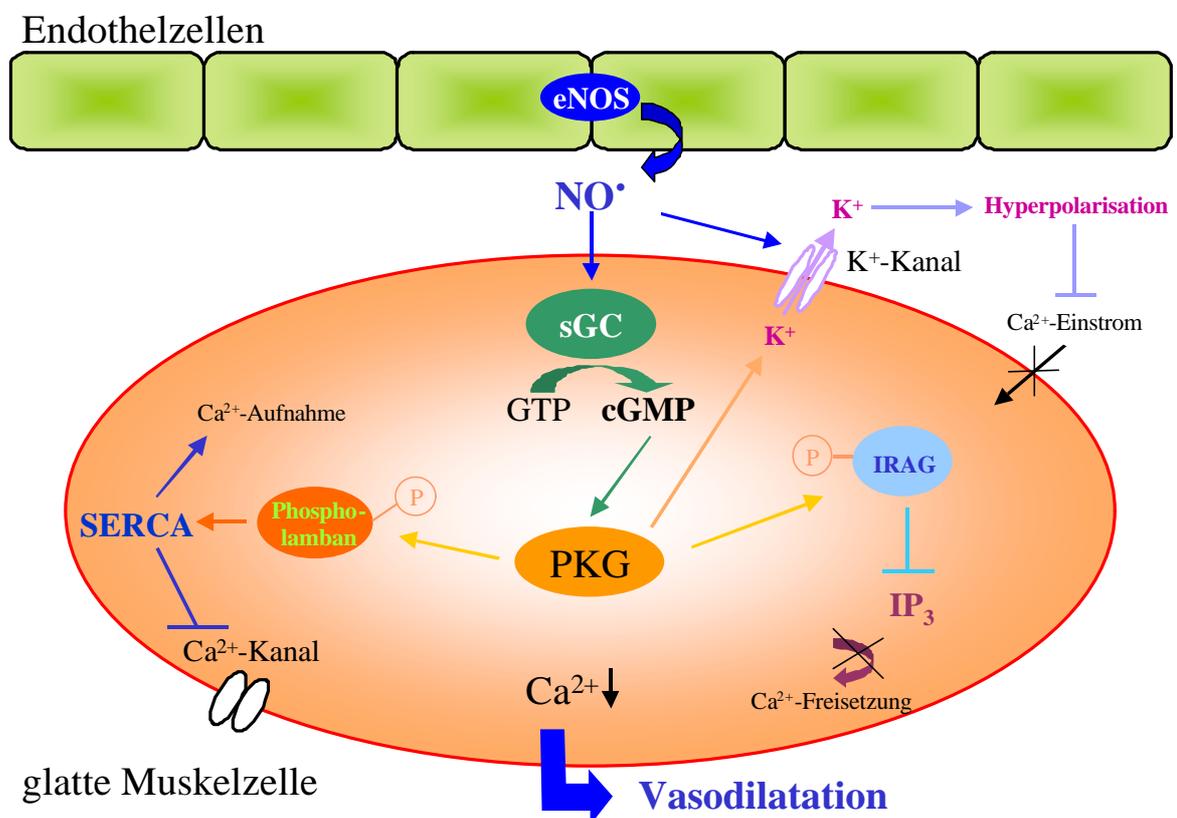


Abb. 1: Mechanismen der Vasodilatation durch den NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweg.

Beim Mechanismus der Vasodilatation glatter Muskelzellen wird NO<sup>•</sup> im Endothel von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gebildet (Abb. 1). Es diffundiert in die glatte Muskelzelle und führt hier zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Die

sGC katalysiert die Umsetzung von Guanosin triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Der Anstieg der cGMP-Spiegel führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG), die dann verschiedene Proteine in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums phosphoryliert. So wurde gezeigt, dass PKG das Protein Phospholamban phosphorylieren kann (25). In der dephosphorylierten Form führen die Monomere dieses Proteins durch Bindung an zytoplasmatische und membranständige Domänen der sarkoendoplasmatischen ATPase (SERCA) zu einer Hemmung dieser Calciumpumpe. Wird Phospholamban phosphoryliert, kommt es zu einer Zusammenlagerung der Monomere zu Pentameren und damit zu einer Aufhebung der SERCA-Hemmung (163). Die Aktivierung der SERCA bewirkt eine Rückspeicherung intrazellulären Calciums in das sarkoendoplasmatische Retikulum, was in der Folge ebenfalls eine Verminderung des Einstroms von extrazellulärem Calcium in den zellulären Calciumspeicher auslöst (24).

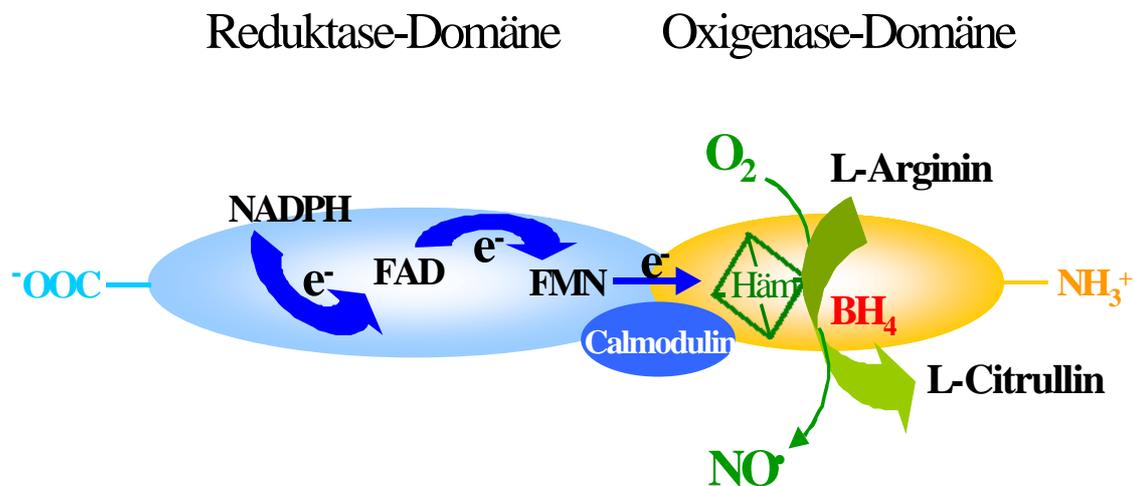
Ein weiterer Mechanismus der  $\text{NO}^{\bullet}$ /cGMP-Signaltransduktion ist die Phosphorylierung von IRAG (IP<sub>3</sub> receptor associated cGMP kinase substrate) durch die aktivierte PKG (155). Phosphoryliertes IRAG führt zur Hemmung der Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)-vermittelten Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Auch diese Hemmung trägt zur Erniedrigung der intrazellulären Calcium-Konzentration bei. Ferner kann  $\text{NO}^{\bullet}$  auch Calcium-abhängige Kaliumkanäle aktivieren, wobei dieser Effekt sowohl direkt durch  $\text{NO}^{\bullet}$  (9) als auch über eine Aktivierung der PKG (152) vermittelt sein kann. In jedem Fall kommt es zu einer Hyperpolarisation der Membran durch den gesteigerten Kaliumausstrom aus der Zelle. Diese Hyperpolarisation beeinträchtigt depolarisierende Signale und erschwert damit die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle.

Zusammengefasst führen alle drei Mechanismen zu einer raschen und effektiven Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration in der glatten Muskelzelle und damit zu einer Vasodilatation (Abb. 1).

### 3.2 Die endotheliale NO-Synthase

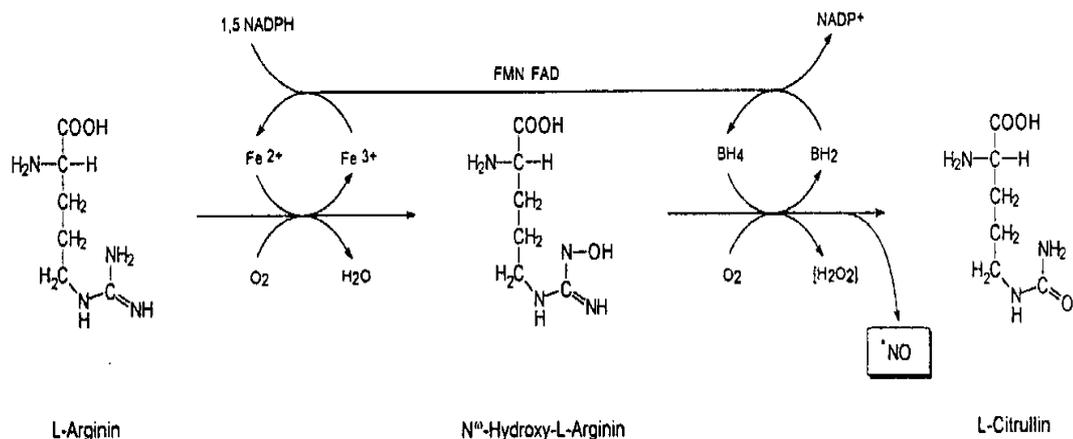
Innerhalb der Gefäßwand wird  $\text{NO}^\bullet$  fast ausschließlich von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in den Endothelzellen gebildet. Insgesamt sind drei Isoformen der NO-Synthasen bekannt: Die endotheliale, neuronale und induzierbare NO-Synthase (110). Sie unterscheiden sich durch die Expression in unterschiedlichen Zelltypen. So kommt die eNOS neben den Endothelzellen auch in Kardiomyozyten und Plättchen vor (182;185). Die neuronale NOS wird hauptsächlich in Nervenzellen gebildet und die induzierbare NOS wird in Makrophagen erst nach Stimulation durch Zytokine als Antwort auf eine Entzündungs- und Immunreaktion exprimiert.

Die in dieser Arbeit untersuchte eNOS ist ein Homodimer mit einer C-terminalen Reduktase- und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung (nach Pfeiffer et. al, 1999) eines eNOS-Monomers mit den Kofaktoren und dem Substrat L-Arginin.

Das eNOS-Dimer wird durch eine tetrahedrale Zinkbindung zwischen je zwei Cysteinresten der Monomere stabilisiert (141) (siehe Abb. 30). Die Reduktase-Domäne kann  $\beta$ -Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) binden (14) und so Elektronen über das gebundene Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Adenin-Mononucleotid (FMN) auf das Häm in der Oxygenase-Domäne übertragen. Für diesen Elektronenfluss ist die Bindung von Calmodulin notwendig (190). Durch die Reduktion des Häm-Eisen zu  $\text{Fe}^{2+}$  wird die Anlagerung von Sauerstoff ermöglicht. Ein weiterer Kofaktor ist das (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin ( $\text{BH}_4$ ), dem eine besondere Bedeutung für die richtige Funktion der eNOS zukommt (siehe unten). Als Substrat dient L-Arginin, das in einer Reaktion mit dem Zwischenprodukt  $\text{N}^{\omega}$ -Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und  $\text{NO}^{\bullet}$  reagiert (Abb. 3) (100). Bei dieser Reaktion werden insgesamt fünf Elektronen übertragen, wobei zwei Elektronen von einem Mol Sauerstoff und drei Elektronen von 1,5 Mol NADPH bereitgestellt werden.



**Abb. 3:** Schematischer Reaktionsablauf der  $\text{NO}^{\bullet}$ -Synthesereaktion (nach Hacker, 1999)

In der Endothelzelle ist die eNOS hauptsächlich in Caveoli eingeschlossen. Diese Caveoli sind Einstülpungen der Plasmamembran. Bei einem Calcium-Einstrom in die Zelle kommt es zur Freisetzung der eNOS (122). Calcium bindet an Calmodulin und dieses an die eNOS (102). So wird der Elektronentransport der eNOS aktiviert und es kann  $\text{NO}^{\bullet}$  gebildet werden. Bindet Caveolin-1 an die Reduktase-Domäne der eNOS, wird der Elektronenfluss wieder unterbrochen. Die eNOS wird inaktiviert und wieder in die Caveoli der Membran eingeschlossen.

Die Regulation der eNOS-Aktivität wird durch viele Faktoren beeinflusst. Der wichtigste Mechanismus ist die negative Rückkopplung durch NO<sup>•</sup> selbst (18). Liegt NO<sup>•</sup> im Überschuss vor, so bindet es an das Fe<sup>2+</sup> der Häm-Gruppe und hemmt die eNOS, die Affinität des Häm-Eisens zu NO<sup>•</sup> ist größer als die zu Sauerstoff, so dass NO<sup>•</sup> bis zu 80-90 % der eNOS-Aktivität unterdrücken kann (1).

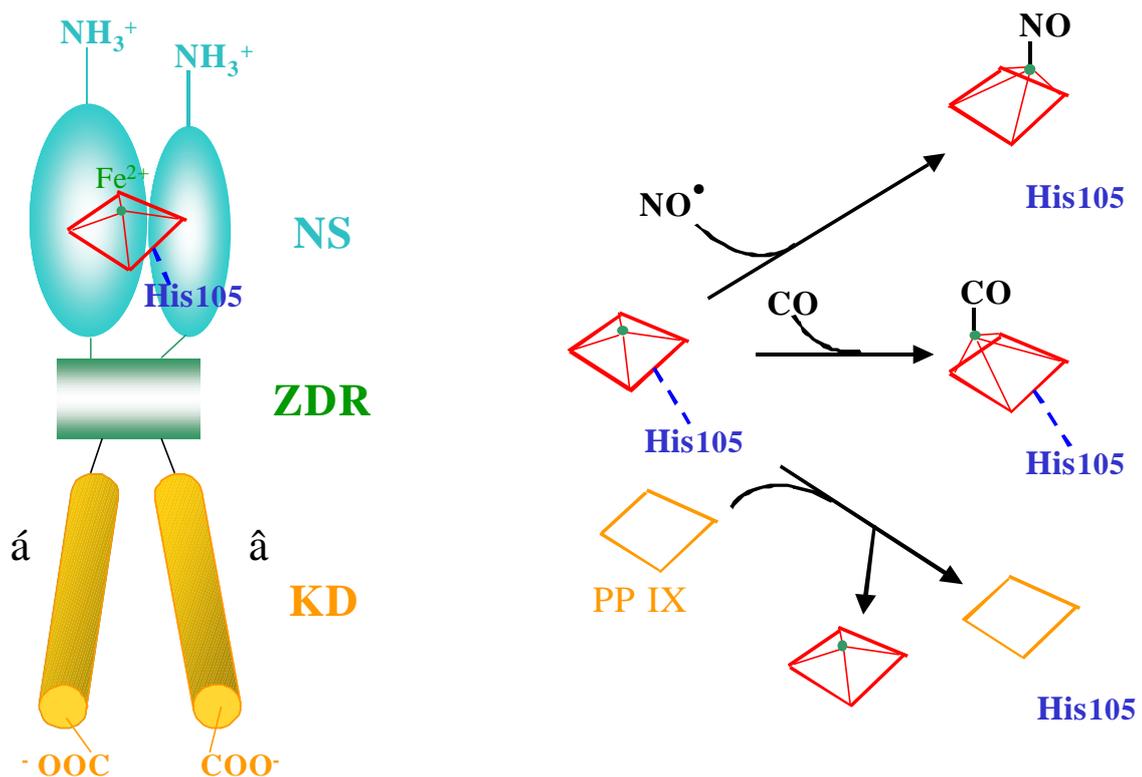
Die eNOS-Expression wird durch das Ausmaß der Transkription des eNOS-Gens in mRNA und deren Stabilität entscheidend bestimmt. Die Regulation der eNOS-Expression ist komplex (123). Zu den Faktoren, die eine vermehrte Expression der eNOS induzieren können zählen mechanische Dehnung, "shear stress" (laminare Strömungsbewegung, die auf die Zellen einwirkt), Lysophosphatidylcholin, cGMP-Analoga, Lipoproteine, Inhibitoren der Proteinkinase C und Zytokine (3;64;126;143;172;189). Ebenso wird eine Steigerung der Transkription durch Wasserstoffperoxid- (36) und Östrogen-Gabe (169) beobachtet. Dagegen wird bei einer bestehenden Hypoxie die Transkription gehemmt (107). Die gebildete mRNA wird durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF stabilisiert (12;85). Der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (125) und hohe Konzentrationen an oxidiertem LDL bewirken allerdings einen schnellen mRNA-Abbau (90).

Das nach der Translation gebildete eNOS-Protein wird zunächst myristoyliert und palmitoyliert. Diese am Golgi-Apparat stattfindenden Prozesse sind für die Lokalisation der eNOS an die Membran notwendig (94). Das gesamte Zytoskelett der Endothelzelle und die Fähigkeit, die eNOS an die Zytoplasma-Membran binden zu können sind ebenfalls eine Voraussetzung für eine eNOS-Aktivierung (145). An der Membran erfolgt dann die Thyrosin- und Serin-Phosphorylierung durch die Proteinkinase A und die Akt-Kinase (35;44). Diese Aktivierung kann wiederum durch die Proteinkinase C (PKC) gehemmt werden (59). Die Bindung eines weiteren Proteins, Hsp90 (heat shock protein 90), an die eNOS bewirkt eine schnellere Ablösung des Caveolin-1 von der eNOS und damit eine schnellere Aktivierung (48).

Studien deuten darauf hin, dass NO-Synthasen unter bestimmten Bedingungen außer NO<sup>•</sup> auch Superoxidradikale (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) generieren können. Die Bildung von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> wurde schon früh bei der neuronalen NO-Synthase beobachtet (57;137). Später konnte dies auch für die eNOS gezeigt werden (26;138). Heute wird eine O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion durch die eNOS auch als „Entkopplung“ bezeichnet. Der Elektronenfluss von NADPH wird fehlgeleitet und der Sauerstoff zu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduziert. Der genaue Mechanismus der Entkopplung ist nicht bekannt, doch zeigen Elektron-Spin-Resonanz (ESR)-Messungen, dass dieser Vorgang Calcium/Calmodulin-abhängig ist und der Kofaktor BH<sub>4</sub> eine bedeutende Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass bei einem Mangel an BH<sub>4</sub> die eNOS O<sub>2</sub><sup>•-</sup> anstatt NO<sup>•</sup> bildet (174;186). Bei einer derartigen Entkopplung könnte die sonst protektive Wirkung der eNOS ins Gegenteil gekehrt werden und sie würde zu einer weiteren Radikalquelle, die den oxidativen Stress in Blutgefäßen zusätzlich erhöht.

### 3.3 Die lösliche Guanylatzyklase

Die Guanylatzyklasen, die die cGMP-Bildung katalysieren, kommen in membran- gebundenen und löslichen Isoformen vor (46;149). Die membrangebundene Guanylatzyklase ist ein Monomer, das zur Gruppe der Rezeptor-gekoppelten Enzyme mit einer membranüberspannenden Einheit gehört (47). Sie wird von verschiedenen Peptidhormonen stimuliert (43). Darüber hinaus gibt es eine Zytoskelett-assoziierte intestinale Guanylylzyklase, die auch als Guanylylzyklase C bezeichnet und durch das Protein Guanylin aktiviert wird. Die Hauptfunktion dieser Isoform besteht in der Regulation von Wasser- und Elektrolythaushalt (8). Die hier untersuchte lösliche Guanylatzyklase (sGC) ist ein Heterodimer mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Abb. 4, links), die beide für die katalytische Aktivität der sGC notwendig sind (56).



**Abb. 4: Links:** Schematische Darstellung der sGC mit der N-terminalen Sequenz (NS), der zentralen Dimerisierungs-Region (ZDR) und der katalytischen Domäne (KD). **Rechts:** Schema der Aktivierung der Guanylatzyklase durch  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{CO}$  und Protoporphyrin IX. Während  $\text{NO}^\bullet$  und  $\text{CO}$  das zentrale  $\text{Fe}$  des Häms aus der planaren Ebene zu einer tetraedrale Konfiguration herausheben, wirkt Protoporphyrin IX durch Verdrängung des Häms.

Insgesamt sind vier Isoformen der Untereinheiten der sGC bekannt ( $\hat{\alpha}_1$ ,  $\hat{\alpha}_2$ ,  $\hat{\beta}_1$ ,  $\hat{\beta}_2$ ) (77). Dabei kommt der 73-82 Kilodalton (kD) großen  $\hat{\alpha}_1$ - Untereinheit und der 70-76 kD großen  $\hat{\beta}_1$ -Untereinheit die größte Bedeutung zu. Beide Untereinheiten bestehen aus einer C-terminalen katalytischen Domäne, einer zentralen Dimerisierungsregion und einem N-terminalen Segment (41;159). Obwohl beide Untereinheiten ein katalytisches Zentrum tragen, scheint die Koexpression beider Untereinheiten für eine vollständige katalytische Aktivität der sGC unerlässlich zu sein. Bei der Umsetzung von GTP zu cGMP müssen außerdem noch zweiwertige Metallionen wie  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  am C-terminalen Ende anwesend sein (128).

Die prosthetische Häm-Gruppe der sGC liegt wahrscheinlich im N-terminalen Segment der  $\hat{\beta}_1$ -Untereinheit (Abb. 4, links) und ist an Histidin 105 gebunden (37;181). Bei der Aktivierung der sGC durch  $NO^\bullet$  wird die Histidin-Bindung aufgebrochen, indem  $NO^\bullet$  als fünfter Ligand an das Häm-Eisen bindet (Abb. 4, rechts). Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung und einer Verschiebung des Absorptionsspektrums (76). Die katalytische Aktivität der sGC kann durch  $NO^\bullet$  bis zu 400fach gesteigert werden (61;166).

Auch Kohlenstoffmonoxid (CO) kann die sGC aktivieren, indem es bei stabiler Histidin 105-Bindung als sechster Ligand an das Häm-Eisen bindet (Abb. 4, rechts). Die Stimulation durch CO führt aber nur zu einer vier- bis sechsfachen Aktivierung, da der gebildete Komplex sehr instabil ist (17). Protoporphyrin IX (PP IX), die eisenfreie Vorstufe des Häm, ist in der Lage unabhängig von  $NO^\bullet$  die sGC zu aktivieren. Dabei verdrängt PP IX das Häm und substituiert die Häm-Bindungsstelle (63). Schließlich wurde vor kurzem über eine Häm-unabhängige Aktivierung der sGC durch 3'-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol (YC-1) berichtet (75;184). Der genaue Mechanismus der YC-1-Aktivierung ist noch nicht geklärt, doch führt die Stimulation der sGC mit  $NO^\bullet$  und zusätzlich YC-1 zu einer weitaus höheren Aktivierung, als  $NO^\bullet$  oder YC-1 alleine (60;116). Als Bindungsstelle für YC-1 wird die  $\alpha$ -Untereinheit der sGC angenommen (43). Neu entwickelte  $NO^\bullet$ -unabhängige Stimulatoren der sGC binden ebenfalls an die  $\alpha$ -Untereinheit der sGC (165).

Die Funktionalität und Expression der sGC kann durch vier verschiedene Mechanismen reguliert werden. So kann NO<sup>•</sup> selbst die sGC-Expression durch negative Rückkopplung beeinflussen, indem es die mRNA-Bildung der Untereinheiten verringert (40;173). Hohe Konzentrationen an zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) können ebenfalls die sGC-Aktivität über eine Aktivierung der Proteinkinase A erniedrigen (133). Der genaue Mechanismus der verringerten Expression der sGC-Untereinheiten durch cAMP ist allerdings noch nicht geklärt. Geringere mRNA-Spiegel der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten, niedrigere Proteinexpression und schwächere sGC-Aktivität konnten auch bei der Inkubation von Zellen mit dem nerve-growth-factor (NGF) und mit Lipopolysacchariden, Zytokinen, sowie Endotoxinen beobachtet werden (93;132;161).

Veränderungen der sGC-Aktivität und Expression könnten eine bedeutende Rolle bei der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen spielen. So zeigen Studien, dass bei einer speziellen Form der Hypertonie, der Desoxycorticosteron (DOCA)-Salz-Hypertonie, die NO<sup>•</sup>-abhängige Relaxation in Rattenaorten eingeschränkt ist und gleichzeitig die Expression der sGC erniedrigt war (53). Außerdem könnte die sGC ein Ziel für oxidative Veränderungen sein, die durch den vaskulären oxidativen Stress in der Blutgefäßwand ausgelöst werden. Hierzu liegen bislang keine ausführlichen Untersuchungen vor.

### 3.4 Endotheliale Dysfunktion

Nur wenige Jahre nach der Entdeckung des EDRF (Endothelium-Derived-Relaxing Factor) (45) und nahezu gleichzeitig mit seiner Identifizierung als Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\bullet$ ) (62;130) wurde deutlich, dass verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Einschränkung der durch den EDRF vermittelten endothelabhängigen Relaxation verbunden sind. Bisherigen Erkenntnissen zufolge ist  $\text{NO}^\bullet$  ein wichtiger antiatherogener und somit protektiver Mediator in der Blutgefäßwand. Es konnte gezeigt werden, dass die atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen in Mäusen mit disruptierem eNOS-Gen, also fehlender vaskulärer  $\text{NO}^\bullet$ -Produktion, nach einem akuten intraluminalen Schaden deutlich stärker ausgeprägt sind als in Kontrolltieren (113).

Untersuchungen am Cholesterol-gefütterten Kaninchen lassen vermuten, dass die Atherosklerosegenese in der Gefäßwand verstärkt abläuft, wenn die endogene  $\text{NO}^\bullet$ -Bildung pharmakologisch inhibiert wird (121). Schließlich ließ sich an diesem Kaninchenmodell ein antiatherosklerotischer Effekt des NO-Donators Pentaerythritoltetranitrat nachweisen (78;81). Somit liegen gute Hinweise dafür vor, dass die Expression der eNOS, verbunden mit einer endogenen Produktion von bioverfügbarem  $\text{NO}^\bullet$ , gefäßprotektive Effekte aufweist.

Störungen des vaskulären  $\text{NO}^\bullet$ /cGMP-Signaltransduktionsweg sind von besonderer Bedeutung für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Dies konnte am Beispiel der Hypercholesterolämie in Kaninchen, Primaten und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen werden (42;50;66;96;188). Die endothelabhängige Relaxation ist ebenfalls bei anderen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus oder Hypertonie deutlich eingeschränkt (110). Diese auch als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnete Störung des  $\text{NO}^\bullet$ /cGMP-Signaltransduktionsweges geht mit einer geringeren Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}^\bullet$  und einer vermehrten Superoxidradikal-Bildung einher (19;55).

Der komplexe Mechanismus, der unter anderem zu einer geringeren NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die endotheliale Dysfunktion könnte z.B. durch eine Hemmung der NO<sup>•</sup>-Produktion verursacht sein. Es könnte auch zu einer Toxifizierung des gebildeten NO<sup>•</sup> kommen, indem es mit Superoxidradikalen zu dem starken Oxidans Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) reagiert. Schließlich wäre denkbar, dass erhöhter oxidativer Stress zu oxidativen Veränderungen von wichtigen Komponenten des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges führt (79). Somit wurden bei der Untersuchung radikalinduzierter Störungen des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges die beiden zentralen Enzyme, die eNOS und die sGC, in dieser Arbeit genauer untersucht.

### 3.5 Fragestellung

Häufige kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer "endothelialen Dysfunktion" einher. Diese Fehlfunktion wird über eine Verminderung der endothelabhängigen Vasorelaxation erfasst, die durch  $\text{NO}^\bullet$  vermittelt ist. Zu den bislang diskutierten Mechanismen zählen eine verminderte  $\text{NO}^\bullet$ -Bildung, eine Störung der  $\text{NO}^\bullet$ -Signaltransduktion sowie die vermehrte Oxidation von  $\text{NO}^\bullet$  durch reaktive Sauerstoffverbindungen. Möglicherweise ist die eNOS selbst an der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen beteiligt, denn im Fall eines  $\text{BH}_4$ -Mangels bildet die eNOS Superoxid. Neuere Daten lassen vermuten, dass die Gabe von  $\text{BH}_4$  die endotheliale Dysfunktion bei Atherosklerose verbessert, obwohl sich hierbei kein vaskulärer  $\text{BH}_4$ -Mangel nachweisen lässt. Eine plausible Möglichkeit zur Erklärung der Verbesserung der endothelialen Funktion durch  $\text{BH}_4$  wäre, dass die eNOS bei Atherosklerose  $\text{BH}_4$  nicht mehr oder nur vermindert binden kann. Es sollte daher der Frage nachgegangen werden, wie sich eine instabile, weniger aktive eNOS-Mutante, die durch einen Austausch einer Aminosäure verändert wurde, in Gegenwart steigender Konzentrationen von  $\text{BH}_4$  verhält.

In weiteren Untersuchungen sollten die Auswirkungen des erhöhten vaskulären oxidativen Stresses auf die Effizienz des  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$ -Weges untersucht werden. Als eines der beiden wichtigsten Zielenzyme (siehe Abb. 1) wurde die sGC gewählt, denn es war nur wenig über die Effekte von oxidativem Stress auf die Expression und Aktivität der sGC bekannt. Außerdem hatten vorausgegangene Untersuchungen des Labors Hinweise dafür erbracht, dass dieses Enzym bei Hypertonie eine stark gehemmte Aktivität aufweist (80). Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit sollte daher sein, den Einfluss von oxidativem Stress auf die sGC in der Blutgefäßwand erstmals systematisch zu studieren. Dabei sollten nicht nur Superoxid sondern auch weitere reaktive Sauerstoffverbindungen wie Peroxinitrit einbezogen werden.

Weitere Untersuchungen sollten am Beispiel tierexperimenteller Modelle die Auswirkungen von pathologisch induziertem vaskulärem oxidativen Stress auf die Expression und Aktivität der sGC quantitativ erfassen. Da Atherosklerose und essentielle Hypertonie zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen zählen, wurden entsprechende Modelle, also die spontan-hypertensive Ratte (SHR) und das cholesterolfütterte Kaninchen ausgewählt.

Insgesamt ergeben sich somit folgende Teilfragestellungen:

1. Könnte eine entkoppelte eNOS eine vaskuläre Radikalquelle sein?
2. Schädigt oxidativer Stress zentrale Proteine des NO<sup>\*</sup>/cGMP-Weges wie die sGC?
3. Welche Rolle spielen die genannten Mechanismen für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen?

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

---

## 4.1 Substanzen und Puffer

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität und Reinheit von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

Substanzen für die Molekularbiologie wurden außerdem bei den Firmen BioRad (München) und Qiagen (Hilden) bestellt.

SNAP wurde in diesem Labor hergestellt nach (39).

SPER/NO war ein Geschenk von Prof. L. Keefer, National Cancer Institute, Frederick, USA.

### Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4

Na <sup>+</sup>	143,07 mM
K <sup>+</sup>	5,87 mM
Ca <sup>2+</sup>	1,60 mM
Mg <sup>2+</sup>	1,18 mM
Cl <sup>-</sup>	124,78 mM
HCO <sup>3-</sup>	25,00 mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,36 mM
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,18 mM
D-Glucose	5,05 mM

### Krebs-Hepes-Puffer pH 7,4

NaCl	99,01 mM
KCl	4,69 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,87 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,20 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,00 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,03 mM
Na-Hepes	20,00 mM
D-Glucose	11,10 mM

### Herstellung Krebs-Henseleit-Puffer

Vor jedem Versuch wurde die Krebs-Henseleit-Lösung frisch angesetzt. Dazu wurden 4 Elektrolytstammlösungen hergestellt, von denen zur Herstellung von 1 l Puffer jeweils 5 ml verwendet wurden.

Stammlösung I	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,235 M
Stammlösung II	KCl	0,939 M
Stammlösung III	MgSO <sub>4</sub>	0,235 M
Stammlösung IV	Ca Cl <sub>2</sub>	0,320 M

Für die Herstellung von einem Liter Krebs-Henseleit Puffer wurden folgende Feststoffe eingewogen:

NaCl 6,9 g  
NaHCO<sub>3</sub> 2,1 g  
D-Glucose 1,1 g

Nach der Zugabe von 5,0 ml jeder Stammlösung erfolgte die Verdünnung auf 1000,0 ml. Bei Raumtemperatur wurde der Puffer auf einen pH-Wert von 7,15 eingestellt. Durch die Begasung mit Carbogas ergab sich ein physiologischer pH-Wert von 7,4.

### P1-Resuspensions-Puffer pH 8,0

50 mM Tris HCl  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A

### P2-Lysispuffer

0,2 M NaOH  
1 % SDS

### 10 x TAE-Puffer pH 7,8

40 mM Tris  
20 mM Na-Acetat  
2 mM EDTA

### P3-Neutralisations-Puffer

3 M K-Acetat-Lösung  
TE-Puffer pH 8,0  
10 mM Tris HCl  
1 mM EDTA

### Blaumarker für Agarose-Gele

0,25 % Bromphenolblau  
30 % Glycerol  
1 x TAE-Puffer pH 7,8

**TBST-Puffer pH 7,4**

10 mM Tris HCl  
 0,15 mM NaCl  
 1 % Tween

**Blotting-Puffer**

25 mM Tris  
 0,19 mM Glycin  
 20 % Methanol

**4 x Sammelgel-Puffer pH 8,8**

0,5 mM Tris HCl  
 0,4 % SDS

**Herstellung des Trenngels**

Acrylamid-Bisacrylamid-  
 Fertiglösung 30 % (37,5:1)  
 4 x Trenngel-Puffer  
 Aqua bidest.  
 TEMED  
 Ammoniumpersulfat-Lsg (10 %)

**Herstellung des Sammelgels**

Acrylamid-Bisacrylamid-  
 Fertiglösung 30 % (37,5:1)  
 4 x Sammelgel-Puffer  
 Aqua bidest.  
 TEMED  
 Ammoniumpersulfat-Lsg (10 %)

**10 x Tankpuffer pH 8,6**

250 mM Tris  
 1,9 mM Glycin  
 0,1 % SDS

**Probenpuffer**

50 mM Tris  
 50 mM EDTA  
 2 % SDS  
 10 % Glycerol  
 0,005 % Bromphenolblau  
 12 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

**4 x Trenngel-Puffer pH 8,8**

1,5 mM Tris HCl  
 0,4 % SDS

	<b>6 %</b>	<b>7,5 %</b>
--	------------	--------------

Acrylamid-Bisacrylamid- Fertiglösung 30 % (37,5:1)	3,76 ml	4,7 ml
4 x Trenngel-Puffer	4,7 ml	4,7 ml
Aqua bidest.	10,24 ml	9,3 ml
TEMED	10,0 $\mu$ l	10,0 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat-Lsg (10 %)	150,0 $\mu$ l	150,0 $\mu$ l

	<b>4,5 %</b>
--	--------------

Acrylamid-Bisacrylamid- Fertiglösung 30 % (37,5:1)	2,4 ml
4 x Sammelgel-Puffer	4,0 ml
Aqua bidest.	9,3 ml
TEMED	10,0 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat-Lsg (10 %)	150,0 $\mu$ l

### **Insekten-Zellen-Lysis-Puffer pH 7,5**

50 mM Tris-HCl

1 % Triton-X 100 sterilfiltrieren, über Nacht bei 4°C lagern

Vor Gebrauch wurden zu 50 ml Lysis-Puffer eine Tablette Complete® (Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim) und 100  $\mu$ l Proteinase-Inhibitor-Coctail (BD Pharmingen, Heidelberg) hinzugefügt.

### **Wasch-Puffer A pH 7,5**

50 mM Tris-HCl

20 % Glycerol

10 ml der 5M NaCl-Stammlösung

1 ml der 200 mM EGTA-Stammlösung sterilfiltrieren, über Nacht bei 4° lagern.

Vor Gebrauch wurden zu 100 ml Wasch-Puffer A zwei Tabletten Complete® (Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim), 200  $\mu$ l Proteinase-Inhibitor-Coctail (BD Pharmingen, Heidelberg) und 100  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt.

### **Wasch-Puffer B pH 7,5**

50 mM Tris-HCl

20 % Glycerol sterilfiltrieren und über Nacht bei 4° lagern.

Vor Gebrauch wurden zu 100 ml Wasch-Puffer B zwei Tabletten Complete® (Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim), 200  $\mu$ l Proteinase-Inhibitor-Coctail (BD Pharmingen, Heidelberg) und 100  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt.

### **NADPH-Elutions-Puffer**

10 mM NADPH in Wasch-Puffer B

**Gewebe-Lysis-Puffer**

5 mM Tris pH 7,6  
 5 mM DTT  
 0,2 mM PMSF in DMSO  
 0,001 % Antipain  
 0,001 % Aprotinin  
 0,001 % Leupeptin  
 0,001 % Benzamidin

**Zell-Homogenisierungs-Puffer**

50 mM Tris HCl  
 0,1 mM EDTA  
 0,1 mM EGTA  
 0,5 mM DTT  
 1  $\mu$ M Pepstatin A  
 2  $\mu$ M Leupeptin  
 2  $\mu$ M Bestatin  
 1 mM PMSF in DMSO

**Stop-Puffer pH 5,5**

20 mM Na-Hepes  
 2 mM EDTA  
 2 mM EGTA

**PBS 0,1 M pH 7,4**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,3 mM

**Coctail-Puffer pH 7,45**

10 mM Na-Hepes  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>

**Herstellung des ESR-Puffers (500ml)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,175 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,805 g
Glukose	0,5 g
NaCl	0,075 g
KCl	0,185 g

Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. 25 g Chelex<sup>®</sup> (BioRad, München) wurden zur Komplexierung von Metallionen hinzugefügt und die Lösung 4 h bei RT gerührt. Dann wurde die Lösung 30 min lang stehen gelassen, damit sich das Chelex<sup>®</sup> absetzt. Vorsichtig wurde sterilfiltriert und erneut der pH-Wert eingestellt. 0,1 g CaCl<sub>2</sub> wurden hinzugefügt und die Lösung nochmals sterilfiltriert. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

## 4.2 Versuchstiere

### 4.2.1 Ratten

Zur Bestimmung der Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase wurden die Lungen und Aortenringe von 15 Monate alten männlichen spontan-hypertensiven Ratten (SHR15) und gleichaltrigen ebenfalls männlichen Wistar-Ratten (WIS15) untersucht.

Für die Inkubationsversuche mit Radikalen wurden die thorakalen Aorten von 4 Monate alten männlichen Wistar-Ratten verwendet.

Die Ratten wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und auf einem Präpariertisch fixiert. Das Fell über dem Thorax wurde entfernt. Mit einer Schere wurde der kaudale Anteil des Corpus sterni und die Rippen durchtrennt und der Thorax geöffnet. Das so freigelegte Herz wurde mit einer Pinzette gefasst und die Aorta unmittelbar an ihrem Ursprung aus dem linken Ventrikel durchtrennt. Die Lunge und der Ösophagus wurden entfernt, die Bauchorgane verlagert und so die Aorta bis zu ihrer Aufteilung im Beckenbereich präpariert. Die Lunge und die Aorta wurden sofort in kalten Krebs-Hepes-Puffer überführt. Das Gefäß wurde dreimal mit Puffer durchgespült und von anhaftendem Binde- und Fettgewebe mit einer chirurgischen Pinzette und Schere befreit. Die in 10 mm lange Segmente geschnittenen Aorten wurden sofort inkubiert oder wie die Lungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Durchführung dieser Studie wurde von der Regierung (O45/87) genehmigt und die Experimente wurden nach den Richtlinien für den Umgang mit Versuchstieren laut Deutschem Tierschutzgesetz und „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (US Institute of Health) durchgeführt.

### 4.2.2 Kaninchen

Für die Untersuchungen zur Aktivität und Expression der sGC bei Atherosklerose wurden bereits präparierte Kaninchenaorten benutzt, die in einer anderen Studie in dieser Arbeitsgruppe verwendet wurden. Die Kaninchen stammten aus der Tierstudie AZ 23.05-230-3-77/99. Es waren weisse Neuseeländer Kaninchen, die zu Beginn 10-12 Wochen alt waren und für insgesamt 16 Wochen  $\pm$  2 Tagen mit 40 g/kg Körpergewicht Standardfutter der Firma Ssniff (Soest) gefüttert. Die Tiere erhielten entweder Standardfutter oder mit 0,75 % Cholesterol angereichertes Futter und entkeimtes Wasser ad libitum.

### 4.2.3 Bestimmung der NO<sup>•</sup>-Freisetzung mit der Iso-NO-Elektrode

#### 4.2.3.1 Eichung der Iso-NO-Elektrode

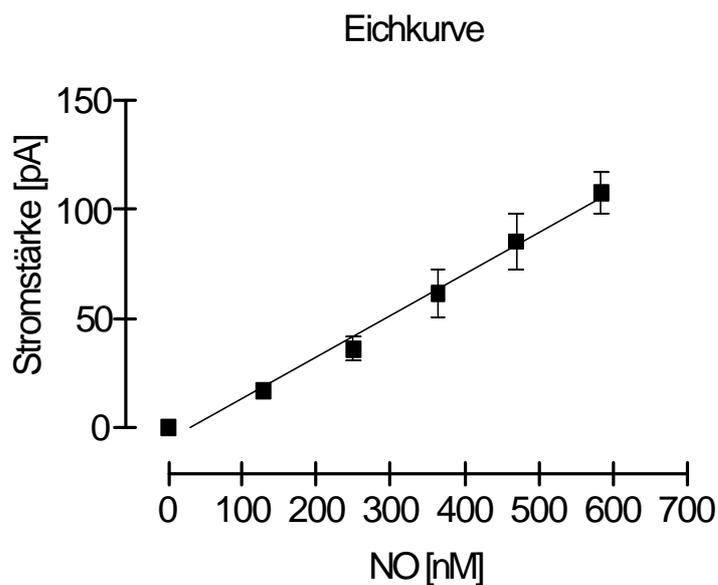
Die NO<sup>•</sup>-Freisetzung der Inkubationslösungen wurden mittels einer NO<sup>•</sup>-spezifischen Elektrode bestimmt (iso-NO, Word Precision Instruments, Inc., Berlin). Dabei wird polarographisch die NO<sup>•</sup>-Konzentration in wässrigen Lösungen bestimmt. NO<sup>•</sup> diffundiert durch eine ausschließlich für Gase permeable Teflon Membran zu der Platin-Arbeits Elektrode und verstärkt den durch das angelegte Potential bereits fließenden Strom. Die gemessenen Ströme sind proportional zur NO<sup>•</sup>-Konzentration in der Lösung. Die Spezifität der Elektrode für NO<sup>•</sup> beruht auf der gegebenen Spannung (spezifisches Halbstufenpotential). Sauerstoff interferiert nicht mit der NO<sup>•</sup>-Messung, da er erst bei einer wesentlich höheren Spannung oxidiert wird.

Die Messungen wurden in einem Volumen von 300  $\mu$ l Krebs-Henseleit-Puffer bei 37 °C unter Rühren mit einem Mikromagneten durchgeführt. Das System wurde täglich mit KI/ KNO<sub>2</sub> geeicht. Dabei wurde NO<sup>•</sup> nach folgender Reaktionsgleichung generiert:



300  $\mu\text{l}$  einer schwefelsauren KI-Lösung ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol/l; KI 0,1 mol/l) wurden vorgelegt und temperiert. Die kumulative Zugabe von jeweils 10  $\mu\text{l}$   $\text{KNO}_2$ -Stammlösung (4  $\mu\text{mol/l}$ ) erfolgte mit einer Hamilton<sup>®</sup>-Spritze durch ein Septum in das verschlossene Messgefäß. Dabei stellten sich für die Eichung folgende  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentrationen in nmol/l ein:

Volumen ( $\mu\text{l}$ )	$\text{KNO}_2$ -Stammlösung (4 $\mu\text{mol/l}$ )
0	0
10	129
20	250
30	364
40	470



**Abb. 5:** Beispiel einer Eichgeraden zur Bestimmung der  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration in Lösungen mit der Iso-NO-Elektrode.

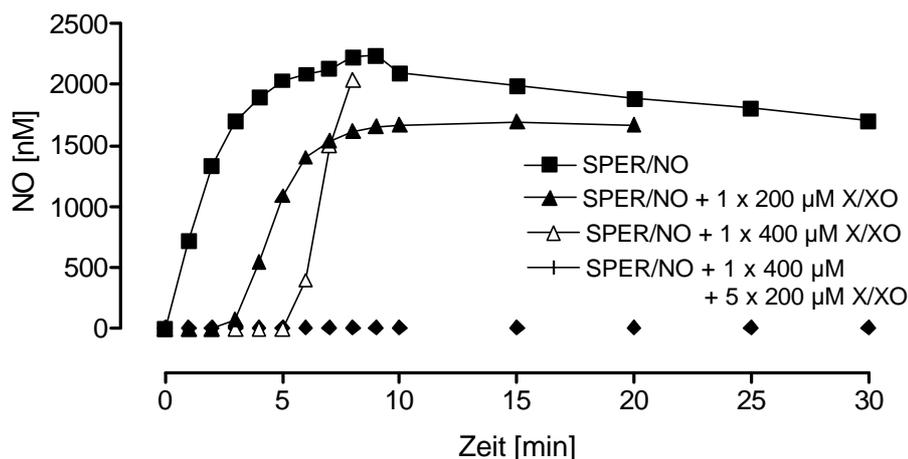
#### 4.2.3.2 Etablierung eines Peroxynitrit-generierenden Systems mit Hilfe der NO<sup>-</sup>-Elektrode

Zur Etablierung eines Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) generierenden Systems wurde mit Hilfe der NO<sup>-</sup>-Elektrode überprüft, ob bei einer Inkubation mit SPER/NO und Xanthin/ Xanthinoxidase (X/XO) NO<sup>-</sup> frei wird. Das vom SPER/NO freigesetzte NO<sup>-</sup> muss vollständig mit den O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikalen aus dem System X/XO zu ONOO<sup>-</sup> reagieren.

Die freigesetzte Menge NO<sup>-</sup> wurde in 500 µl Krebs-Henseleit-Puffer bei 37 °C nach folgendem Schema bestimmt:

NO <sup>-</sup> -Donator	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Donator	Dauer der Messung
200 µM SPER/NO	---	30 min
200 µM SPER/NO	1 x 200 µM Xanthin	20 min
200 µM SPER/NO	1 x 400 µM Xanthin	8 min
200 µM SPER/NO	1 x 400 µM Xanthin + 5 x 200 µM Xanthin	30 min

Alle Messungen wurden in Gegenwart von 14,4 U/l Xanthinoxidase und 200U/l Katalase durchgeführt.

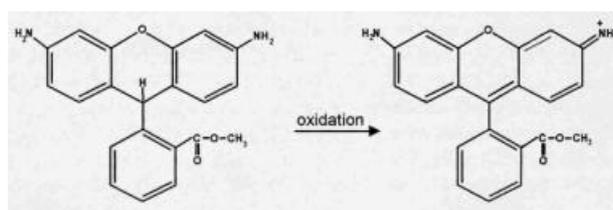


**Abb. 6:** Messung der freigesetzten NO<sup>-</sup>-Menge aus den Systemen 200 µM SPER/NO, + 1 x 200µM Xanthin, 1 x 400 µM Xanthin, 1 x 400 µM + 5 x 200 µM Xanthin in Gegenwart von 14,4 U/l Xanthinoxidase. Erst mit der Zugabe von 1 x 400 µM + 5 x 200 µM X/14,4 U/l XO konnte die NO<sup>-</sup>-Bildung unterbunden werden und es wurde für 30 min ONOO<sup>-</sup> gebildet.

Die einmalige Gabe von 200  $\mu\text{M}$  SPER/NO führte zu einem steilen Anstieg der  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration (Abb. 6). Nach 9 min war die maximal freigesetzte Menge von 2238,5 nM  $\text{NO}^\bullet$  erreicht. Über den Messzeitraum von 30 min nahm die Menge an freigesetztem  $\text{NO}^\bullet$  aus SPER/NO nur langsam wieder ab. Die Zugabe von 1 x 200  $\mu\text{M}$  X/14,4 U/l XO führte zu einer verzögerten  $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung. Für 3 min wurde  $\text{ONOO}^\bullet$  gebildet, doch die zugefügte Menge Xanthin reichte nicht aus, um das  $\text{NO}^\bullet$ -Signal länger zu unterdrücken. Die einmalige Gabe von 400  $\mu\text{M}$  X/14,4 U/l XO verlängerte die  $\text{ONOO}^\bullet$ -Bildung auf insgesamt 5 min. Um den Einfluss von  $\text{NO}^\bullet$  während der Inkubation ausschließen zu können, musste ein System gefunden werden, das für den gesamten Inkubations-Zeitraum von 30 min kein  $\text{NO}^\bullet$  freisetzt. Mit der Gabe von 200  $\mu\text{M}$  SPER/NO, einer Initialdosis von 400  $\mu\text{M}$  X/14,4 U/l XO konnte für 5 min die  $\text{NO}^\bullet$ -Bildung unterdrückt werden. Die weitere Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Xanthin alle 5 min verhinderte schließlich die  $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung im System. So wurde für 30 min kontinuierlich  $\text{ONOO}^\bullet$  generiert.

#### 4.2.4 Quantitative Bestimmung von Peroxynitrit mit Dihydrorhodamin 123

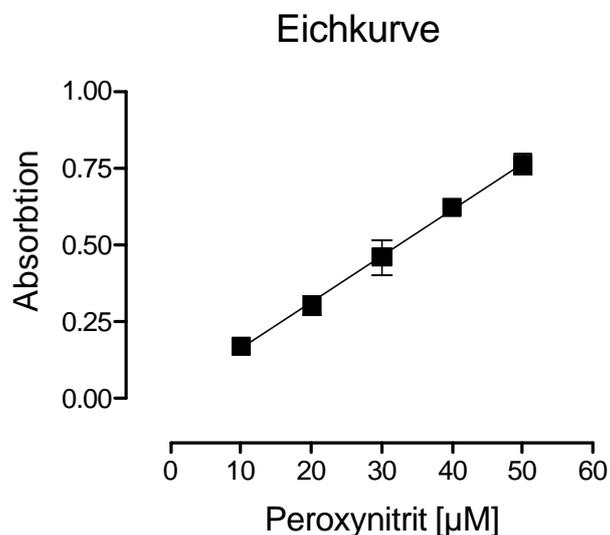
Als Grundlage wurde die Methode von Crow et al. modifiziert (28). Bei dieser Methode wird Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) durch Peroxynitrit zu Rhodamin 123 oxidiert. Rhodamin 123 ist gefärbt und kann photometrisch bei 500 nm vermessen werden.



**Abb. 7:** Bildung des Farbstoffs Rhodamin 123 (rechts) durch Oxidation von Dihydrorhodamin 123 (links) z.B. durch Peroxynitrit.

#### 4.2.4.1 Eichung des Systems

Mit authentischem Peroxynitrit (Alexis Biochemicals, Grünberg) wurde zunächst das System geeicht. 1 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) mit 100  $\mu\text{M}$  DTPA als nicht-redox aktiver Metallchelator, und 200  $\mu\text{M}$  DHR wurden in einer Küvette vorgelegt. Das authentische Peroxynitrit wurde auf Eis gelagert und mit  $\text{N}_2$  begast um es vor Oxidation zu schützen. Zur Eichung wurden 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{M}$  authentisches Peroxynitrit in die Küvette pipettiert, gemischt und sofort bei 500 nm vermessen.



**Abb. 8:** Beispiel einer Eichgeraden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Peroxynitrit mit DHR 123. Das System wurde mit authentischem Peroxynitrit geeicht.

Durch lineare Regression der Eichgeraden konnte die Steigung ermittelt werden, aus der dann die freigesetzte Menge Peroxynitrit pro min berechnet wurde.

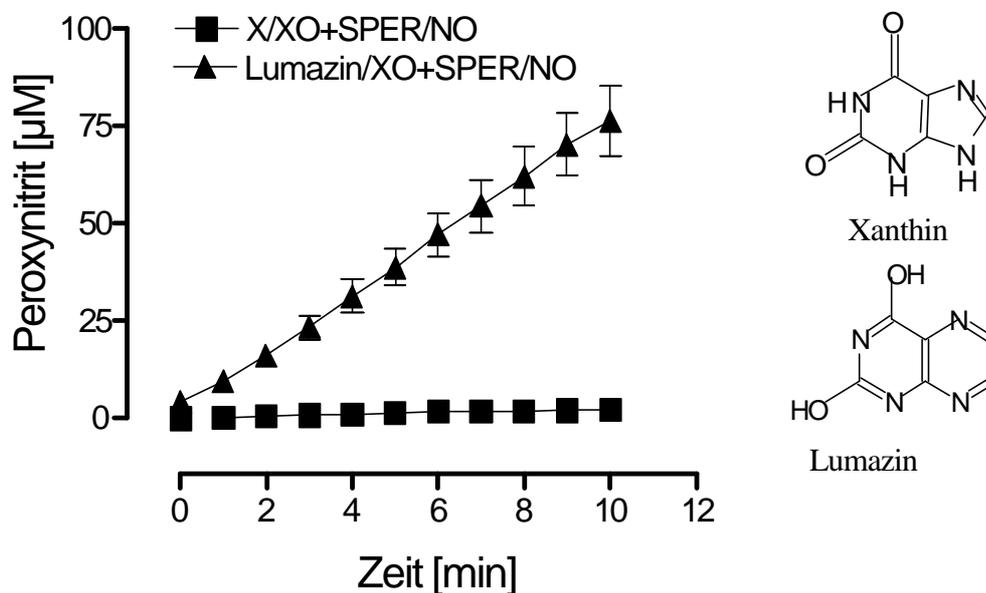
#### 4.2.4.2 Messung der Peroxynitrit-Bildungsrate

Zur Bestimmung der freigesetzten Peroxynitrit-Menge wurden die  $\text{NO}^{\bullet-}$ - bzw.  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -generierenden Substanzen in folgenden Konzentration verwendet:

- |    |  |  |                         |
|----|--|--|-------------------------|
| 1. | 200 $\mu\text{M}$ SPER/NO<br>nach 5 min erneut | 1 x 400 $\mu\text{M}$ Xanthin<br>1 x 200 $\mu\text{M}$ Xanthin | 14.4 U/l Xanthinoxidase |
| 2. | 200 $\mu\text{M}$ SPER/NO                      | 1 x 1 mM Lumazin   | 58 U/l Xanthinoxidase   |

Die Substanzen wurden in eine Küvette mit 1ml Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 + 200 U/l Katalase + 100 $\mu$ M DTPA + 200 $\mu$ M DHR, gelöst und über einen Zeitraum von 10 min vermessen (Messung der Absorption jede Minute).

Bei der Überprüfung der tatsächlich aus dem 1. System SPER/NO/X/XO freigesetzten Menge Peroxynitrit, zeigte sich, dass die ONOO $^{\bullet}$ -Bildungsrate sehr gering war. Bei der photometrischen Bestimmung ergab sich eine Bildungsrate von nur 0,13  $\mu$ M ONOO $^{\bullet}$ /min (Abb. 9).



**Abb. 9:** Peroxynitrit-Bildung, gemessen anhand der Oxidation von DHR 123 in Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4. Die gebildete Menge Peroxynitrit in dem System SPER/NO/Lumazin/XO war mit 7,5  $\mu$ M ONOO $^{\bullet}$ /min deutlich größer, als die von SPER/NO/X/XO freigesetzte Menge von 0,13  $\mu$ M ONOO $^{\bullet}$ /min.

Um eine größere Menge ONOO $^{\bullet}$  entstehen zu lassen, wurde anstatt Xanthin das Derivat Lumazin zusammen mit XO als O $_2^{\bullet-}$ -generierendes System verwendet. Bei der Inkubation mit Lumazin (1mM), Xanthinoxidase (58 U/l) und SPER/NO (200  $\mu$ M) wurden für 30 min kontinuierlich 7,5  $\mu$ M Peroxynitrit/min freigesetzt.

### 4.3 Inkubationen

Die Inkubationen der Rattenaortenringe erfolgte bei 37 °C mit frisch präpariertem Gewebe in 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer, der mit Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Alle Inkubationen wurden in der Gegenwart von 200 U/l Katalase durchgeführt, um den Einfluss von Wasserstoffperoxid auszuschließen.

Zu jeder Radikalinkubation wurde parallel eine Vehikel-Inkubation unter gleichen Versuchsbedingungen, nur ohne Radikalzugabe durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

#### 4.3.1 SPER/NO

Bei dieser Inkubation wurde mit 200 µM SPER/NO für insgesamt 4 h inkubiert. Der Puffer wurde alle 30 min komplett ausgetauscht.

#### 4.3.2 Xanthin/Xanthinoxidase

Zur Erzeugung von Superoxidradikalen wurden die Aorten mit 200 µM Xanthin und 14,4 U/l Xanthinoxidase inkubiert. Alle 5 min (48 x) wurden weitere 200 µM Xanthin hinzugefügt. Nach 30 min erfolgte ein Komplettaustausch des Puffers. Die Inkubation dauerte ebenfalls 4 h. Dieses System ließ  $O_2^{\bullet-}$  mit einer Rate von  $24,8 \pm 2,0$  µM/min entstehen (180).

#### 4.3.3 SPER/NO und Xanthin/Xanthinoxidase

Zur Generierung von Peroxynitrit wurden 200 µM SPER/NO und Xanthin mit der Initialdosis von 400 µM und dann alle 5 min 200 µM Xanthin zusammen mit 14,4 U/l Xanthinoxidase zugeben. Wieder wurde alle 30 min der Puffer komplett erneuert und es wurde insgesamt für 4 h inkubiert.

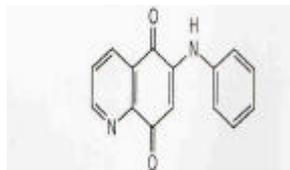
#### 4.3.4 SPER/NO und Lumazin/Xanthinoxidase

Eine höhere Dosis Peroxynitrit konnte bei der Inkubation mit Lumazin/Xanthinoxidase und SPER/NO erzeugt werden. Lumazin (siehe Abb. 9) ist ein Derivat des Xanthins, das zusammen mit Xanthinoxidase ebenfalls  $O_2^{\bullet-}$  generiert, es aber nicht zur Bildung von Urat kommt, welches ein Peroxynitrit-Fänger ist.

Die Inkubation erfolgte nach demselben Schema, mit 200  $\mu$ M SPER/NO, zunächst 1 mM Lumazin, dann alle 10 min erneut die Zugabe von 1 mM Lumazin. Die Menge an Xanthinoxidase wurde auf 58 U/l erhöht. Es wurde für insgesamt 4 h inkubiert, wobei alle 30 min der Krebs-Henseleit-Puffer gewechselt wurde.

#### 4.3.5 LY 83583

Zur Bildung intrazellulärer Superoxidradikale wurden die Aorten mit 10  $\mu$ M 6-Anilinochinolin-5,8-chinon (LY 83583) in begastem Krebs-Henseleit Puffer für 4 h inkubiert.



**Abb. 10:** Strukturformel des 6-Anilinochinolin-5,8-chinon (LY 83583).

LY 83583 zeigte in Abwesenheit von Gewebe keine Radikalbildung (88).

### 4.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes in zytosolischen Fraktionen erfolgte nach der Methode von Bradford (13). Vor jeder Messung wurde mit verschiedenen Konzentrationen an bovinem Serumalbumin (BSA) eine Kalibrierung vorgenommen. Nach linearer Regression der Eichgeraden wurde die Steigung berechnet. Unter denselben Bedingung wurden dann die Proben vermessen und der Proteingehalt der zytosolischen Fraktionen bestimmt.

Die Proteinbestimmung in den Zellysaten erfolgte nach Lowry (95) mit dem modifizierten DC<sup>TM</sup> Protein Assay von BioRad (Hercules, Ca, USA), da Triton X (Bestandteil des Lysispuffers) die Bradfordbestimmung stört. Auch hier wurde jedesmal zuvor eine BSA-Eichgerade erstellt und dessen Steigung zur Berechnung der Proteingehalte in den Zellysaten herangezogen.

### 4.5 Zellkultur

#### 4.5.1 Verwendete Zellkulturen und Medien

##### 4.5.1.1 SF 9 Zellen

SF 9 Zellen sind Insektenzellen aus den Ovarien des „Fall armyworm *Spodoptera frugiperda*“ (BD Pharmingen, Heidelberg).

Als Medium wurde TNM-FH Medium von der Firma BD Pharmingen (Heidelberg) oder Grace's Insect Cell Medium + 10 % Fötale Rinderserum (FBS) + 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (alles von GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) + 0,1 % Pluronic F-68 verwendet. Wegen der leichten Kontamination der Zellen wurde dem Medium 2,5 µg/ml Fungizone® (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) zugesetzt.

Die Zellen wurden bei 27 °C in T 150er Kulturflaschen kultiviert. Eine CO<sub>2</sub>-Zufuhr war nicht notwendig. Zum Splitten (Aufteilung konfluenter Zellen auf neue Kulturflaschen) wurden die Flaschen gegen den Handballen geklopft, so dass die Zellen sich lösen. Dann wurde die entsprechende Menge frisches Medium zugegeben, gemischt, und die Zellen auf die vorgesehene Anzahl Flaschen verteilt. Je nach Dichte der Zellen wurde 1:2 oder 1:3 gesplittet.

##### 4.5.1.2 293 HEK-Zellen

Die humanen embryonalen Nierenzellen (293 HEK-Zellen) waren ein Geschenk von der Arbeitsgruppe K. K. Griendling, Emory University, Atlanta, GA, USA und von der Arbeitsgruppe Prof. Schrör, Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universität Düsseldorf.

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit L-Glutamin und 4,5 mg/ml Glucose + 10 % (FBS) + 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (alles von GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) verwendet.

Die Zellen wurden im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C auf Petrischalen kultiviert. Die Passagierung (Aussäen der Zellen einer konfluente Petrischale auf neue Kulturschalen) im

Verhältnis 1:5 erfolgte alle 2-3 Tage durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA (0,05 %/0,5 mM) (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) nach einmaligem Waschen mit PBS.

### 4.5.1.3 Anzahl der Zellen

Die Zellzahl wurde bei den SF 9-Zellen mit dem Hemacytometer unter dem Mikroskop bestimmt. Das Hemacytometer ist ein Objektträger mit eingraviertem Zählkreuz. Eine Verdünnung der Zell-Suspension wurde mit der Pipette zwischen Objektträger und Deckplättchen verteilt. Es wurden die Zellen in insgesamt 10 Quadranten gezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Anzahl der Zellen pro ml ergab sich dann wie folgt:

Mittelwert der Zellzahl pro Quadrant  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times 10^4 =$  Zellen/ml

Die HEK-Zellen ließen sich mit dem Coulter Counter<sup>®</sup> Z1 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA) zählen. Die Zell-Suspension wurde 1:200 in Isoton<sup>®</sup> (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) verdünnt. Der Counter wurde so eingestellt, dass er im Bereich von 7-13  $\mu$ m die Zellen zählte. Die Anzahl der Zellen pro ml errechnete sich nach folgender Formel:

Anzahl der Zellen  $> 7 \mu\text{m} \times 400 =$  Zellen/ml

## 4.5.2 Transfektionen

### 4.5.2.1 Transfektion von SF 9 Zellen

Die Transfektion der SF 9 Zellen erfolgte mit dem BaculoGold<sup>™</sup> Transfection Kit (BD Pharmingen, Heidelberg). Dabei handelt es sich um eine Kotransfektion. Der Nukleare Polyhedrosis Virus *Autographa californica* (AcNPV) ist in der Lage SF 9 Zellen zu infizieren. Die hier verwendete BaculoGold<sup>™</sup> DNA ist modifizierte AcNPV-DNA, die ohne erfolgreiche Kotransfektion mit dem Transfer-Vektor-DNA-Konstrukt nicht überleben kann. Verfahren wurde nach der Anleitung des Hersteller-Protokolls, wobei 50 –70 % konfluente

Sf 9 Zellen parallel mit 0,5 µg BaculoGold™ Virus-DNA und 5 µg der gewünschten Plasmid-DNA im pVL 1393 Transfektionsvektor infiziert wurden. Nach 4 h Inkubation bei 27 °C wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Für weitere 4-5 Tage wurden die Zellen inkubiert und dann auf erste Anzeichen der Infektion untersucht.

### 4.5.2.2 Typische Merkmale infizierter Sf 9 Zellen

Transfizierte Zellen hatten einen vergrößerten Zellkern und waren im Ganzen größer als nicht-infizierte Zellen. Die Zellen hafteten nicht mehr am Flaschenboden, sondern schwammen frei im Medium. Mit 500 µM Catechol Lösung (+ 50 µM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ließen sich die mit dem pVL 1393-Vektor transfizierten Zellen gelb anfärben.

### 4.5.2.3 End-point-dilution-assay

Zur Überprüfung der Effektivität der Transfektion wurde ein „End-point-dilution-assay“ (EPDA) durchgeführt. Der modifizierte AcNPV-Virus wird nach erfolgreicher Kotransfektion mit der DNA im pVL 1393-Vektor von den Sf 9 Zellen amplifiziert und in das Medium abgegeben. So kann anhand des Überstandes bereits transfizierter Zellen eine Überprüfung der Effektivität der Transfektion, bzw. der Virustiter bestimmt werden. Beim EPDA wurden nicht-infizierte Zellen auf einer 12 Well-Platte (1 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well) ausgesät und mit 100, 10, 1 und 0 µl Medium von transfizierten Zellen infiziert. Nach 3 Tagen müssen auch die nur mit 1µl Überstand infizierten Zellen im Well die typischen Anzeichen der Transfektion zeigen (siehe 2.5.2.2).

### 4.5.2.4 Virusamplifikation

Zur Vermehrung des nach Kotransfektion überlebendigen BaculoGold™ -Virus wurde 1 ml Medium bereits transfizierter Zellen zu den 30 ml Medium frisch ausgesäter Sf 9 Zellen gegeben. Diese Infektion musste mehrere Male wiederholt werden, um einen ausreichend hohen Virus-Titer zu erhalten. Anhand eines Western Blot wurde die Expression des überexprimierten Enzyms überprüft.

### 4.5.2.5 Stabile Expression von Proteinen in 293 HEK-Zellen

Zur stabilen Expression von Proteinen in 293 HEK-Zellen wurde SuperFect<sup>®</sup>-Reagenz (Qiagen, Hilden) benutzt. Dieses speziell gestaltete, aktivierte Dendrimer besitzt die Eigenschaft, DNA in eine kompakte Struktur zu betten, so dass sie optimal in die Zelle aufgenommen werden kann. Die SuperFect<sup>®</sup>-DNA-Komplexe tragen eine positive Ladung und können an negativ geladene Rezeptoren an der Zelloberfläche binden. So werden sie in das Innere der Zelle geschleust und lagern sich an Endosome. Der SuperFect<sup>®</sup>-DNA-Komplex führt zur pH-Inhibition lysosomaler Nucleasen und erhöht so die Stabilität des Komplexes.

Zur Transfektion wurden pro Plasmid 40-80 % konfluente HEK-Zellen auf einer 60 mm Petrischale ausgesät. 5 µg der Plasmid DNA (bovine/mutierte eNOS im pcDNA3-Vektor; pcDNA3-Vektor alleine als Kontrolle) und 20 µl SuperFect<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) wurden zunächst in 150 µl serumfreien DMEM 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit 1 x mit PBS gewaschen und mit 2 ml komplettem DMEM versetzt. Zu der DNA-SuperFect<sup>®</sup>-Mischung wurde 1 ml DMEM zugegeben, durch zweimaliges Pipettieren gemischt. Dann wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C wurde 2 x mit PBS gewaschen und frisches Medium zugesetzt.

Die transfizierten Zellen wurden so lange passagiert bis genug Zellen für fünf 150 mm Petrischalen pro Plasmid vorhanden waren. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde dem Medium Geneticin-Sulfat (G418-Sulfat)-Lösung (PAA Laboratories, Linz; Österreich) in einer Konzentration von 800 µg/ml zugesetzt. Der pcDNA3-Vektor trägt das Resistenzgen gegen G418-Sulfat. In Gegenwart des Antibiotikums starben alle die Zellen ab, die nicht mit dem pcDNA3-Vektor (mit und ohne bovine/mutierte eNOS-DNA) infiziert waren. Die überlebenden transfizierten Zellen wurden isoliert, kultiviert und auf ihre Proteinexpression hin getestet. Nach 3 Wochen wurde die Dosierung des G418-Sulfat auf 400 µg/ml reduziert und nach 6 Wochen wurde das selektive Antibiotikum nicht mehr dem Medium zugesetzt, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen bereits stabil transfiziert waren.

Zur Sicherung der Zelllinie wurden Zellen von jedem Typ (Vektor-, Wildtyp und Mutantentransfiziert) von einer 100 mm Petrischale trypsinisiert und in speziellem DMEM (+ 20 % FBS, 10 % DMSO) langsam bis zu  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

### 4.5.2.6 Gewinnung von Zellhomogenaten

Die Sf 9 Zellen wurden mit einem Zell-Schaber von den Flaschen gelöst und in ihrem Medium in 50 ml Falcon Röhren überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei  $1000\text{ } \times\text{ } g$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 8 ml Insekten-Zellen-Lysis-Puffer resuspendiert.

Die 293 HEK-Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurde die entsprechende Menge Zell-Homogenisierungs-Puffer (3ml/150 mm - und 1,5 ml/100 mm Petrischale) zugegeben und die Zellen mit dem Zell-Schaber von den Petrischalen gelöst. Die Zell-Suspension wurde in Falcon Röhren gesammelt.

Die Sf 9 und die 293 HEK- Zell-Suspensionen wurden 4 x für je 10 s mit Ultraschall (150 W) sonifiziert. Es folgte eine zusätzliche Lyse der Zellen für 30 min auf Eis und die Proteinbestimmung nach Lowry.

## 4.6 Biochemische Untersuchungen

### 4.6.1 Enzymisolierung und Aufreinigung

#### 4.6.1.1 Herstellung einer zytosolischen Fraktion aus Rattenaorta

Zur Isolation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) aus der Rattenaorta und Lunge wurden die Gewebe zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde in einem mechanischen Zerkleinerer pulverisiert und in 2 ml Gewebe-Lysis-Puffer mit dem Ultra-Turrax T8 (Ika Labortechnik, Staufen) auf Stufe 6 homogenisiert. Danach wurde 3 x zentrifugiert, zunächst mit 100 x g für 10 min, dann der Überstand mit 20000 x g für 15 min und dieser Überstand mit 105000 x g für 1 h. Die so erhaltenen zytosolischen Fraktionen wurden ausaliquotiert, ihr Proteingehalt mit der Bradford-Methode bestimmt, und bei - 80 °C tiefgefroren.

#### 4.6.1.2 Gewinnung der endothelialen NO-Synthase aus Zellen

Eine große Menge Sf 9 Zellen wurde mit 1 ml Überstand von vorherigen Transfektionen, die einen hohen Virustiter enthielten, infiziert. Dem Medium wurde außerdem 4 mg/l Hemin, 1 µM Riboflavin und 10 µM Sepiapterin zugesetzt.

Für 3 Tage wurden die Sf 9 Zellen bei 27 °C inkubiert, dann geerntet und ein Zellhomogenat hergestellt. Nach der Lyse der Zellen wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 3000 x g abgetrennt und der Überstand in vorgekühlten Falcon Röhrchen gesammelt. Die 2'5'-ADP-Sepharose 4B (Amersham, Piscataway, NJ, USA) wurde zuvor in destilliertem Wasser zum Gel gequollen (1 g gefriergetrocknetes Pulver ergab 3,5 - 5 ml Gel) und mit 200 ml destilliertem Wasser pro Gramm Sepharose Pulver gewaschen. Mit dem 5 fachen Volumen Waschpuffer A wurde das Gel in Poly-Prep<sup>®</sup>-Chromatographie-Säulen (BioRad, Hercules, CA, USA) bei 4 °C equilibriert. Der Überstand der Zell-Zentrifugation wurde auf die Säulen gegeben und das Protein für 2 h im Kühlraum durch ständiges vorsichtiges Durchmischen an die 2'5'-ADP-Sepharose 4B gebunden. Danach

wurde 2 x mit 10 ml Waschpuffer A und 2 x mit 10 ml Waschpuffer B gewaschen. Der NADPH-Elutionspuffer wurde frisch hergestellt und das Protein mit 3 x 500 µl Elutionspuffer von der 2'5'-ADP-Sepharose 4B abgetrennt. Die Eluate wurden durch Zentrifugation in Ultrafree-15 Gefäßen mit Biomax-PB Polyethersulfon-Membran (Millipore, Bedford, MA, USA) 15 fach konzentriert.

Die Aufreinigung der eNOS aus dem 293 HEK-Zellhomogenat wurde nach demselben Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden vorher jedoch nicht mit Hemin, Riboflavin oder Sepiapterin behandelt.

### 4.6.2 Enzymaktivitätsbestimmungen

#### 4.6.2.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität löslicher Guanylatzyklase

Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase wurde nach der Methode von Schultz et. al. bestimmt (158).

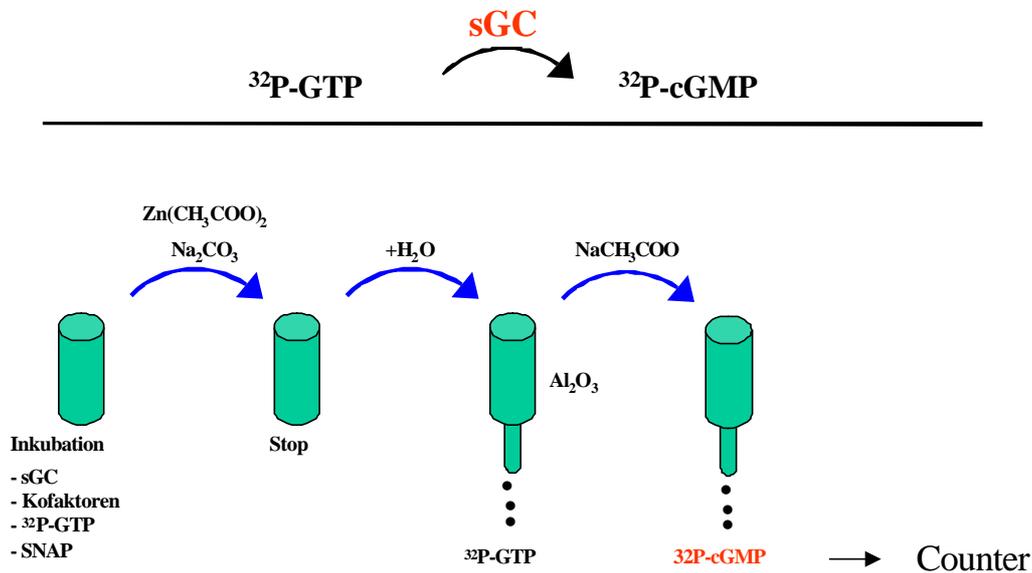


Abb. 11: Prinzip der Bestimmung der spezifischen Aktivität löslicher Guanylatzyklase.

Sie basiert auf der durch das Enzym katalysierten Bildung von  $\alpha^{32}\text{P-cGMP}$  aus zugesetztem radioaktiv-markiertem  $\alpha^{32}\text{P-GTP}$ . Über eine Aluminiumoxid-Säule, auf der das gebildete  $\alpha^{32}\text{P-GMP}$  gebunden wird, können  $\alpha^{32}\text{P-GTP}$  und  $\alpha^{32}\text{P-cGMP}$  voneinander getrennt werden. Anhand der Konzentration an gebildetem  $\alpha^{32}\text{P-cGMP}$  lässt sich die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase berechnen.

40  $\mu\text{l}$  der zytosolischen Fraktion wurden zu einem Reaktions-Mix gegeben, der folgende Zusammensetzung hatte: Triethanolamin Puffer (50 mM, pH 7,4), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM cGMP, 0,5 mg/ml Rinderalbumin (BSA) und 3 mM DTT. Um eine SNAP-Dosiswirkungskurve zu erstellen, wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  SNAP in den Konzentrationen 0 - 10 mM zugesetzt (EK: 0, 1, 10, 30, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ). Zum Schluss wurden 0,5 mM  $\alpha^{32}\text{P-GTP}$  (spezifische Aktivität 3-5-TBq/mmol) zu den 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen hinzugefügt und die Reaktion gestartet. Es wurde exakt für 12 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Durch gleichzeitige Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  wässriger Zinkacetatlösung (125 mM) und 500  $\mu\text{l}$  wässriger Natriumcarbonatlösung (125 mM) wurde die Reaktion gestoppt. Durch eine Zentrifugation für 10 min mit 8000 x g bei 4 °C wurde die Zink-Carbonat-Fällung abgetrennt. Der Überstand wurde auf die mit 1 ml Aluminiumoxid gefüllten Säulen gegeben, die vorher mit 0,2 M Perchlorsäure gespült worden waren. Die Elution des  $^{32}\text{P-cGMP}$  erfolgte mit 10 ml wässriger Natriumacetatlösung (250 mM). Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen und direkt im Counter vermessen. Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase in pmol cGMP/mg Protein/min wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{CPM} - \text{CPM-Leerwert}}{\text{Säulenausbeute (\%)} \times \text{Spez. Radioaktivität (TBq/mmol)}} = \frac{\text{pmol Citrullin}}{\text{mg Protein in mg/ 40}\mu\text{l} \times \text{Inkubationszeit in min}}$$

#### 4.6.2.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase

Das Prinzip zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase (15) beruht auf der durch das Enzym katalysierten Umsetzung von  $^{14}\text{C-L-Arginin}$  zu  $\text{NO}^\bullet$  und  $^{14}\text{C-L-Citrullin}$ . Nicht umgesetztes  $^{14}\text{C-L-Arginin}$  bleibt auf der AG 50 W Resin-Säule zurück und nur die radioaktiv markierte Menge  $^{14}\text{C-L-Citrullin}$  wird mit dem Counter erfasst. Zunächst

wurden die Kofaktor-Stammlösungen in folgenden Konzentrationen hergestellt, ausaliquotiert und tiefgefroren: 4 U/μl Calmodulin (die gelieferten gesamten 100 000 Units werden in 2,5 ml Coctail-Puffer zu 40 U/μl gelöst und nochmals mit Coctail-Puffer 1:10 zu 4 U/μl verdünnt); 10 mM L-Arginin; 110 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM Citrullin; 0,2 mM FAD; 0,2mM FMN; 10 mM Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) wurden in N<sub>2</sub>-begastem Wasser gelöst; 20 mM NADPH-Lösung wurden jedesmal frisch hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden Master-Mixe hergestellt, die 0, 1, 5, 10, 30, 50 μM BH<sub>4</sub> enthielten. Die anderen Kofaktoren waren in folgenden Endkonzentrationen enthalten: Calmodulin 0,1 U/μl, L-Arginin 100 μM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Citrullin 1 mM, FAD 4 μM, FMN 4 μM, NADPH 1 mM. Das Reaktionsvolumen betrug 200 μl.

In 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen wurde die entsprechende Menge Tris-Puffer pH 7,5 vorgelegt (bei der Bestimmung von Zell-Homogenaten waren das 39 μl Tris-Puffer und bei dem aufgereinigtem Enzym 138 μl). Zu dem Tris-Puffer wurden dann 46 μl des jeweiligen Master-Mixes und 15 μl <sup>14</sup>C-L-Arginin (50 μCi, 1,85 MBq, NEN, Boston, USA) gegeben. Nach der Zugabe von 100 μl Zellhomogenat oder 1μl gereinigtem Enzym wurde die Reaktion für 15 min bei 37 °C gestartet. In der Zwischenzeit wurden die Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatographie-Säulen (BioRad, Hercules, CA, USA) mit genau 1 ml AG 50 W Resin (BioRad, Hercules, CA, USA) gefüllt, das in Stop-Puffer für mehrere Tage equilibriert worden war. Szintillationsgefäße wurden unter die Säulen gestellt und die mit 1 ml Stop-Puffer versetzten Reaktionsgemische auf die Säulen gegeben. Es wurde noch 2 x mit je 1 ml Stop-Puffer gewaschen und das Eluat (ca. 3 ml) mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versehen und im Counter vermessen. Die spezifische Aktivität der eNOS in pmol Citrullin/mg Protein/min wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{CPM} - \text{CPM-Leerwert}}{\text{CPM (100 \% } ^{14}\text{C-L-Arginin)}} \times \frac{20\,000}{\text{(pmol zugesetztes kaltes L-Arginin)}} = \frac{\text{pmol Citrullin}}{\text{mg Protein pro Probe} \times \text{Inkubationszeit in min}}$$

### 4.6.3 Western Blot

#### 4.6.3.1 Protein-Auftrennung

Die Auftrennung der Proteine aus Zelllysaten oder zytosolischen Fraktionen erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (89;124). Dazu wurden ein Trenngel und darauf ein Sammelgel gegossen. Die gewünschten Proteinkonzentrationen wurden im Verhältnis 1:1 oder mit mindestens 20 % Probenpuffer gemischt, zur Denaturierung für 5 min auf 95 °C erhitzt und danach in die Geltaschen geladen. Als Molekulargewichtsmarker dienten vorgefärbte Precision Protein Standards<sup>®</sup> und Kaleidoscope Standards<sup>®</sup> (BioRad, München). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit 1 x Tankpuffer. Der Gellauf dauerte ca. 1 h bei einer Spannung von 150 V.

Zur Darstellung der Dimere der eNOS (Cold-SDS-Gel) wurden nur 6 %ige Trenngele gegossen, die Enzym-Proben wurden mit Proben-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, nicht denaturiert, sondern sofort auf die vorgekühlten Gele geladen. Der Gellauf erfolgte in einem Eisbad im Kühlraum bei konstanten 30 mA für ca. 3 h.

#### 4.6.3.2 Protein-Transfer

Die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde in einer Blotting Apparatur (BioRad, München), gefüllt mit Blotting-Puffer, bei 90 V für 1 h durchgeführt.

#### 4.6.3.3 Protein-Detektion

##### 4.6.3.3.1 Inkubation mit Antikörpern

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran über Nacht in 6 % Blocking Milch (in TBST-Puffer) bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Am folgenden Tag wurde noch eine Stunde bei RT inkubiert, dann 3 x mit TBST-Puffer gewaschen.

**sGC-Antikörper:** Cayman Chemicals, Alexis, Grünberg; polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase; Verdünnung 1: 2500 in 3 % Blocking Milch (in TBST-Puffer), Inkubation für 2 h bei RT.

**eNOS-Antikörper:** BD Transduction Laboratories, Lexington, USA; monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen das eNOS-Protein; Verdünnung 1:2000, Inkubation für 1 h bei RT.

Nach der anschließenden Waschphase mit 4 x TBST-Puffer erfolgte eine Inkubation für 1 h mit einem 2. Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-IgG (1:5000) (BioRad, München), der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Wieder wird 4 x mit TBST-Puffer gewaschen und die Membran für 60 s mit ECL-Western-Blotting-Detection Reagenz (Amersham, Freiburg) behandelt. Dabei wurde zur Detektion des gebundenen Antikörpers auf der Membran die Aktivität der Peroxidase gemessen. Der verwendete Film (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) wurde für wenige Sekunden bzw. Minuten auf die mit Folie überzogene Membran aufgelegt, belichtet und dann entwickelt.

### 4.6.3.3.2 Coomassie-Färbung

Nach dem Gellauf wurden die Polyacrylamid-Gele mit den aufgetrennten Proteinen 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 1 h mit Bio-Safe<sup>TM</sup> Coomassie (BioRad, Hercules, CA, USA) inkubiert. Anschließend wurde so lange mit destilliertem Wasser gewaschen bis die blauen Banden sichtbar wurden.

### 4.6.3.3.3 Silber-Färbung

Die nach der Protein-Auftrennung erhaltenen Gele wurden für 30 min in einer Mischung aus 50 % Methanol und 5 % Essigsäure inkubiert. Danach wurde zunächst mit 50 % Methanol und dann mit destilliertem Wasser je 15 min lang gewaschen. Für 1,5 min wurde mit 0,02 % Natriumthiosulfat-Lösung inkubiert und dann zweimal mit Wasser ebenfalls für 1,5 min gewaschen. Lichtgeschützt und im Kühlraum folgte eine 30 minütige Inkubation mit 0,1 % Silbernitrat-Lösung. Wieder wurde 2 x mit Wasser gewaschen und dann die Gele mit einer Lösung aus 0,04 % Formaldehyd und 2 % Natriumcarbonat 5 min lang entwickelt. Durch Zugabe von 5 % Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt.

### 4.6.3.4 Oxyblot™

Mit dem Oxyblot™-System (Intergen, Burlington, MA, USA) kann man Modifikationen von Proteinen detektieren, die durch oxidative freie Radikale verursacht werden. Diese Modifikationen der Proteine können Veränderungen in der Seitenkette an Methionin, Histidin und Tyrosin sein, sowie auch Cystein-Disulfidbindungen. Ebenso kann es zu metallkatalysierten Oxidationen der Proteine kommen, was zur Ausbildung von Carbonylgruppen (Aldehyde und Ketone) an Lysin-, Arginin-, Prolin- oder Threonin- Resten führt. Bei dem Oxyblot™ werden solche entstandenen Carbonylgruppen an Aminosäure-Resten der Proteine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen (DNP-Hydrazone) umgesetzt, welche mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden können.

Die transfizierten HEK-Zellen wurden lysiert und die Proteine in dem Homogenat durch Zugabe von 6%iger SDS-Lösung denaturiert. Die Derivatisierung von 20-50 µg Gesamtprotein erfolgte für 15 min bei Raumtempertur mit 1x DNPH Lösung und wurde mit der Neutralisationslösung gestoppt. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel (siehe 2.6.3) aufgetragen und die derivatisierten Proteine getrennt. Nach dem Proteintransfer, der wie beim Western Blot durchgeführt wurde, wurden freie Bindungsstellen der Membran über Nacht mit 1 % BSA in TBST-Puffer geblockt.

Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die erste Inkubation mit dem herstellereigenen Kaninchen-Antikörper speziell für DNP-Hydrazone-derivatisierte Proteine (1: 150 in 1 % BSA in TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurde die Inkubation mit dem 2. Antikörper gegen Kaninchen IgG ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Da der 2. Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, konnte die Membran genauso wie bei einem Western Blot mit Chemilumineszenz-Reagenz inkubiert werden und auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden (siehe 2.6.3.3.1).

### 4.6.3.5 Quantitative Auswertung von Western-Blots und Oxyblot™

Die exprimierten Proteinmengen auf dem belichteten und entwickelten Film wurden mit dem Gel Doc 1000 (BioRad; München) und der dazugehörigen Software Quantity One® (Version 4.1.1) ausgewertet.

## 4.6.4 Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen (ESR)

### 4.6.4.1 Theorie

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Messung dient der Untersuchung paramagnetischer Verbindungen mit einem freien Elektron. Radikale wie  $\text{NO}^\bullet$  und  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tragen ein freies Elektron und anhand dessen physikalischer Eigenschaften lassen sich Konzentrationsbestimmungen der Radikale in Lösung durchführen.

Der Elektronen-Spin ist der Eigendrehimpuls  $S = 1/2$  des Elektrons. Bringt man das Elektron in ein äußeres, zeitlich konstantes, homogenes Magnetfeld  $H_0$ , so verursacht das Magnetfeld einen Anstoß des rotierenden Elektrons und es führt eine Präzessionsbewegung (schwankende, kreisende Bewegung um eine Achse) aus. Die Umlauffrequenz wächst mit der Stärke des angelegten  $H_0$ -Feldes und wird als Larmor-Frequenz  $\boldsymbol{n}_L$  bezeichnet:

$$\boldsymbol{n}_L = g \cdot \boldsymbol{m}_B \cdot H_0/h$$

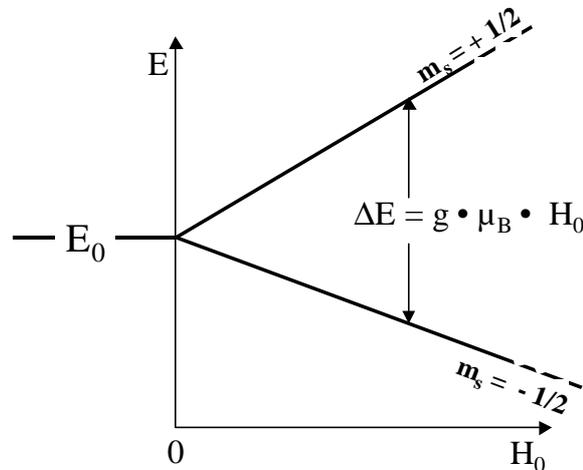
$g$  =  $g$ -Faktor (2,002319)

$\boldsymbol{m}_B$  = Bohrsches Magneton

$H_0$  = Magnetfeld

$h$  = Plancksches Wirkungsquantum

Bei der Ausrichtung des Elektronen-Spins im Magnetfeld  $H_0$  gibt es eine parallele und eine antiparallele Einstellung zu  $H_0$ . Dies wird durch die magnetische Quantenzahl  $m_s$  beschrieben, die nur die Werte  $m_s = + 1/2$  oder  $- 1/2$  annehmen darf. Geht man nun davon aus, dass das betrachtete Radikalmolekül in seinem Grundzustand ohne Magnetfeld die Energie  $E_0$  besitzt, so spaltet sich diese Energie in einem äußeren Magnetfeld  $H_0$  gemäß den beiden erlaubten magnetischen Spinquantenzahlen  $m_s = \pm 1/2$  in zwei Energieterme auf (Abb.12).



**Abb. 12:** Aufspaltung der Energieniveaus  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  im äußeren Magnetfeld  $H_0$

Bei dieser auch als Zeeman-Effekt bezeichneten Energieaufspaltung ist die Größe der Aufspaltung proportional dem von außen angelegten Magnetfeld  $H_0$ .

Das Resonanzphänomen des Elektronen-Spins tritt auf, wenn ein zweites Magnetfeld  $H_1$  hinzugefügt wird, das senkrecht zu  $H_0$  steht und mit der Larmor-Frequenz rotiert. Der Elektronen-Spin führt nun eine spiralförmige Auf- und Abwanderung durch, was quantenmechanisch ein Umklappen der Spinrichtung von  $m_s = +\frac{1}{2}$  auf  $m_s = -\frac{1}{2}$  bedeutet. Es werden also Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus durchlaufen.

Man kann diese Elektronen-Spin-Resonanz auch auslösen, indem man eine zirkular polarisierte elektromagnetische Welle einstrahlt, deren  $H_1$ -Vektor senkrecht zur  $H_0$ -Richtung liegt und deren Frequenz gleich der Larmor-Frequenz  $\nu_L$  ist. Wird die Energiedifferenz zwischen den beiden Energietermen in Form eines elektromagnetischen Lichtquanten eingestrahlt, so kommt man zur grundlegenden Gleichung für die Elektronen-Spin-Resonanz:

$$h\nu = g \cdot \mu_B \cdot H_0$$

Die Absorption verläuft proportional zu der Anzahl  $n$  der untersuchten Moleküle. Somit ist eine quantitative Bestimmung der gebildeten Radikale möglich.

#### 4.6.4.2 Spin-Trap-Lösung für die $O_2^{\cdot-}$ -Messung

Da die  $O_2^{\cdot-}$ -Radikale nur sehr kurzlebig sind, wurden der Messung sogenannte Spin-Traps zugesetzt. Das sind meist zyklische Hydroxylamine, die in der Lage sind, das freie Elektron aufzunehmen und selbst ein stabileres Radikal bilden, das dann vermessen werden kann.

Da es sich bei diesen Versuchen um Messungen in intakten Zellen handelte, wurde der Spin-Trap CMH (1-Hydroxy-3-carboxy-methyl-pyrrolidin) verwendet, der leicht in die Zellen gelangt und dort die Elektronen von den Radikalen aufnimmt.

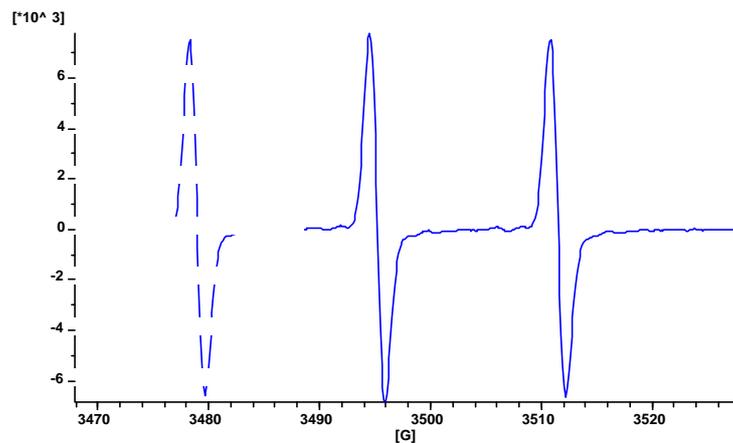
#### 4.6.4.3 Messgerät

Die ESR-Spektren wurden mit dem Bruker EMX<sup>®</sup> ESR Spektrometer (Bruker Biospin Corp., Billerica, MA, USA) aufgenommen und mit der dazugehörigen Software WIN EPR (Version 2.11, ebenfalls Bruker) ausgewertet.

Die Einstellungen des ESR-Spektrometers wurden wie folgt festgelegt:

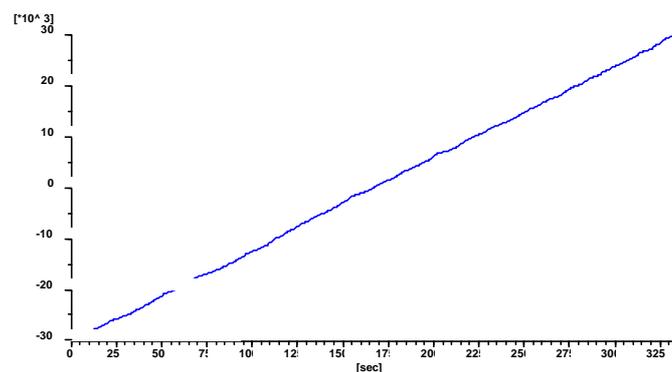
	<b><math>O_2^{\cdot-}</math>-Radikalmessung</b>	<b><math>NO^{\cdot}</math>-Radikalmessung</b>
Field sweep	60 G [Gauss]	160 G
Microwave frequency	9,82 GHz	9,39 GHz
Microwave power	20 mW	10 mW
Modulation amplitude	2 G	3 G
Conversion time	655 ms	2621 ms
Time constant	328 ms	328 ms

Die Eichung erfolgte mit 50  $\mu$ M Xanthine/0,025 U Xanthinoxidase. Zunächst wurde ein „Field-Scan“ aufgezeichnet.



**Abb. 13:** Beispiel eines Field Scans, aufgenommen nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  Xanthine,  $0,025 \text{ U}$  Xanthinoxidase.

Dabei wurde der für CMH typische Triplett-Peak aufgenommen. Er entsteht durch das Splitting des  $\text{CM}^\bullet$ -Elektrons nach Reaktion mit  $\text{O}_2^\bullet$ . Das freie Elektron des  $\text{CM}^\bullet$  spaltet sich nach Bestrahlung mit elektromagnetischen Lichtquanten im magnetischen Feld in zwei Energieniveaus auf, die jedoch wiederum aus 3 kleineren Niveaus bestehen. Somit wird bei der Messung 3 mal eine Amplitude (elektronenspinspezifischer Triplett-Peak, Abb. 13) aufgenommen. Der erste Peak wurde zur Einstellung des Gerätes herangezogen. Die Größe des magnetischen Feldes (center field) am höchsten Punkt des Peaks wurde als fester Parameter eingestellt. Die einzelnen Proben wurden also bei konstantem Magnetfeld für 5 min vermessen („Time Scan“).



**Abb. 14:** Beispiel eines Time Scan über 5 min, aufgenommen nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  Xanthine,  $0,025 \text{ U}$  Xanthinoxidase.

Der Time Scan stellt die Produktionsrate der gebildeten Radikale dar, die Konzentration konnte anhand linearer Regression errechnet werden.

### 4.6.4.4 Messung von Superoxidradikalen

24 h vor der Messung wurden die Zellen mit nur 5 %igem Medium versetzt. Zur Präparation der Zellen wurden sie 1 x mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach dem Ablösen von der Platte wurden sie mit DMEM-Medium auf ein Volumen von 10 ml neutralisiert und kurz gemischt. Eine kleine Menge dieser Suspension wurde zum Zählen der Zellen zurückbehalten. Die Zell-Suspension wurde 7 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml ESR-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und mit ESR-Puffer auf ein Endvolumen von 100 µl gemischt.

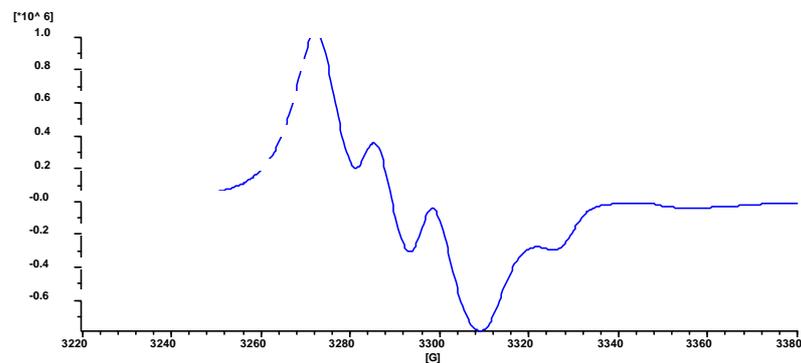
Auf Eis wurde 1 ml ESR-Puffer, der 1 mM DTPA als Metallchelator enthielt, für mindestens 15 min mit N<sub>2</sub> begast und genau 2,4 mg CMH wurden hinzugefügt, um eine Konzentration von 1 mM zu erreichen. 5 µl der Zellsuspension wurden zusammen mit 95 µl der Spin-Trap-Lösung in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und dann in eine 50 µl Glaskapillare (Corning, New York, NY, USA) gesaugt. Die Kapillare wurde unten versiegelt und sofort in das ESR-Spektrometer gestellt.

Bei einem Teil der Versuche wurden die Zellen mit 1 mM L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-methylester) für 1 min inkubiert und dann vermessen, oder sie wurden mit 10 µM Calcium Ionophor stimuliert.

### 4.6.4.5 Messung von NO<sup>•</sup>-Radikalen

Die Durchführung der NO<sup>•</sup>-Messung wurden nach der beschriebenen Methode von Kleschyov et.al. (73) vorgenommen. Zunächst wurde die kolloidale Fe(DETC)<sub>2</sub>-Lösung hergestellt. 4,5 mg Na-DETC und 2,8 mg FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O wurden getrennt in deoxygeniertem Krebs-Hepes-Puffer gelöst, zu gleichen Teilen gemischt und sofort in einem Eppendorf Kombitip aufgesaugt. Die Konzentration des Fe(DETC)<sub>2</sub> in Krebs-Hepes-Puffer betrug 0,5 mM. Das gebildete Kolloid war schwach gelb gefärbt und zeigte für mindestens 30 min keine Aggregation.

Die 293 HEK-Zellen wurden 24 h vor dem Experiment mit nur 5 %igem DMEM-Medium versetzt. Die konfluenten Zellen auf einer 100 mm Petrischale wurden 1 x mit PBS gewaschen und dann mit 10 ml der  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Krebs-Hepes-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zell-Schaber von den Petrischalen gelöst, die Zellsuspension in eine 1 ml Spritze aufgesaugt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die gefrorene Proben-Säule wurde in ein Finger-Dewargefäß gegeben und mit dem ESR-Spektrometer vermessen.



**Abb. 15:** Beispiel eines ESR-NO -Signals von 293 HEK-Zellen behandelt mit  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -Kolloid für 30 min.

Die Zellen wurden zunächst unbehandelt vermessen und dann wurde die Änderung des Signals bei einer Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Ca-Ionophor untersucht.

## 4.7 Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.7.1 Präparation und Analyse von DNA

#### 4.7.1.1 Genotyp der verwendeten Bakterien-Stämme

DH5 $\alpha$ F' F' / endA1 *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *supE44* lambda<sup>-</sup> *thi-1* *recA1*  
*gyrA* *relA1* (*lacZY A-argF*)<sub>U196</sub> (*m80dlacZΔM15*),  
 GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

XL 1.Blue *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac*  
 [F' *proAB* *lacI*<sup>q</sup>*ZΔM15* Tn10 (Tet<sup>R</sup>)],  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande

XL 10-Gold Tet<sup>R</sup> Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1*  
*gyrA96* *relA1* *lac* Hte [F' *proAB* *lacI*<sup>q</sup>*ZΔM15* Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>Rj</sup>]<sup>a</sup>  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande

#### 4.7.1.2 Herstellung von LB-Medium und Agar-Platten

Das Luria Bertani-Vollmedium (LB) enthielt 1 % Trypton , 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl. Für LB-Platten wurden dem Medium 1,2 % Agar und zur Selektion von Bakterien, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz enthielten, 100 μg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C. Zur Lagerung wurden die Platten längstens für zwei Monate bei 4 °C aufbewahrt.

##### 4.7.1.2.1 Transformationen

Transformationen mit *E.coli* wurden nach der Methode von Hanahan (1985) durchgeführt, wobei 1-10 ng Plasmid oder der Ligationsansatz auf die noch gefrorenen Zellen gegeben wurden. Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurde der Hitzeschock für 45 s bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt und anschließend 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben. Die

Zellen wurden zum besseren Wachstum zunächst für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden sie bei 6000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl LB-Medium wieder aufgenommen und auf den Agar-Platten ausplattiert (50-100 µl). Die Bakterienkolonien wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubator angezüchtet. Die Transformationen mit den XL 1 Blue und XL 10 Gold-Zellen von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) wurden nach der Anleitung des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

### **4.7.2 Plasmid-DNA Isolierung und Aufreinigung**

#### **4.7.2.1.1 DNA-Plasmid Mini-Präparation**

Die Mini-Präparation von DNA-Plasmiden wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Eine Kolonie von der Agar-Platte wurde mit der Pipettenspitze aufgenommen und in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Startkultur wurde für mind. 8 h bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml der Startkultur der angeimpften Bakterien wurden durch Zentrifugation (5 min, 6000 x g) geerntet und in 250 µl P1-Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl P2-Lysispuffer und kurzem Stehenlassen (nicht länger als 5 min) wurden 250 µl P3-Neutralisationspuffer zugefügt. Bei diesem Schritt wurden alle anderen Zellbestandteile ausgefällt, nur die DNA und RNA blieb in Lösung. Der Zusatz von RNase zum Neutralisationspuffer entfernte dann auch die RNA. Die ausgefallten Zellbestandteile wurden für 10 min bei 10000 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen eiskaltem Ethanol (96 %). Das Pellet wurde nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g) in 50 µl TE-Puffer wieder gelöst. Zum Teil wurde die alkalische Lyse auch mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) durchgeführt, dann wurde anhand des Protokolls der Firma isoliert.

#### **4.7.2.1.2 DNA Präparationen in größerem Ansatz**

Die Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit den QIAGEN Plasmid Midi<sup>®</sup>, Maxi<sup>®</sup> oder für Transfektionen mit dem EndoFree Maxi Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) isoliert und gereinigt. Die Präparationen wurden nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Das Prinzip entspricht dem der Mini-Plasmid-Präparation, wobei jedoch 25-100 ml Bakterienkultur angezchtet wurden. Die gesamte über Nacht gewachsene Kultur wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (6000 x g, 15 min, 4 °C) geerntet. Resuspension, Lyse und Neutralisation erfolgten in entsprechend größeren Ansätzen. Die DNA wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol 1 x gewaschen. In 50-100 µl TE-Puffer wurde die DNA gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Bei der Aufreinigung mit dem EndoFree Maxi Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) erfolgte nach der Abtrennung der ausgefällten Zellbestandteile eine Inkubation des Lysats mit Endotoxin-Removal-Buffer<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) auf Eis für 30 min. Endotoxin-freie DNA war für die spätere Transfektion von Zellen in vivo notwendig.

### **4.7.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA im jeweiligen Puffer wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm vermessen. Dabei wurden UVette<sup>®</sup>-Küvetten (Eppendorf, Hamburg) verwendet und eine DNA-Verdünnung in einem Endvolumen von 50 µl gemessen.

### **4.7.2.2 DNA-Restriktion**

Für das sequenzspezifische Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) verwendet. Ein Unit Enzym wurde für die Spaltung von 1µg Plasmid-DNA eingesetzt und die DNA eine Stunde lang bei entsprechender Temperatur inkubiert. Puffer und Reaktionstemperatur wurden nach Herstellerangaben gewählt.

### **4.7.2.3 Auftrennung der DNA-Fragmente**

DNA-Fragmente wurden in 0,7 % oder 2 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt und analysiert. Als Gelpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 5 µl Blaumarker versetzt und in die Geltaschen geladen. Als DNA-Größen-Standards wurden eine 100

Basenpaar-Leiter, 1kb DNA Ladder (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe und NEB, Frankfurt), DNA-Längenstandards X (0,07-12,2 kbp), (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) und Lambda DNA/*Hind* III Markers (Promega, Mannheim) verwendet. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zum Agarose-Gel konnte die DNA nach der Auftrennung im UV-Licht analysiert werden. Die Bilder wurden mit dem Gel Doc 1000<sup>®</sup> (BioRad, München) aufgenommen und die DNA-Fragmentgröße abgeschätzt.

### 4.7.2.4 DNA-Isolierung und -Reinigung

Zur Isolation von DNA-Fragmenten bestimmter Größe, wurde die DNA zunächst in einem 0,7 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Im UV-Licht sichtbar gemacht, wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Agarosestücke mit DNA-Fragmenten größer als 10 kb wurden in dreifachem Volumen 6 M Na-Iodid-Lösung bei 50 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 5 µl „Glasmilch“, einer DNA-bindenden Silikat-Matrix, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 50 °C. Der „Glasmilch“/DNA-Komplex wurde durch kurzes Anzentrifugieren (30 s, 10000 x g) sedimentiert und anschließend 3 x mit je 1 ml kalter Wasch-Lösung (50 mM NaCl, 10 mM Tris/ HCl, 2,5 mM EDTA 50 % Ethanol (v/v), pH 7,5) gewaschen. Dann folgte eine 5-minütige Inkubation der DNA mit 20 µl 1 x TE-Puffer bei 50 °C. Dabei wurde die DNA von der Matrix gelöst und durch Zentrifugation (30 s, 10000 x g) von dieser getrennt. Der Überstand mit dem isolierten DNA-Fragment wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei kleinen DNA-Fragmenten erfolgte die Reinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden), der nach demselben Prinzip funktioniert.

### 4.7.2.5 DNA-Ligation

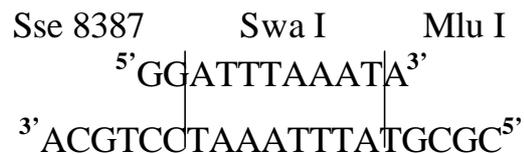
Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu ligieren wurde der Vektor linearisiert und mit alkalischer Phosphatase (NEB, Frankfurt) für 1 h bei 37 °C behandelt. In einigen Fällen musste der behandelte Vektor noch aus dem Gel isoliert und aufgereinigt werden. Es wurden 0,1-0,2 µg linearisierte Vektor-DNA und die 3-5 fache molare Menge des gereinigten DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 Unit T4 DNA-Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) für 2-3 h bei Raumtemperatur

oder über Nacht bei 16 °C. Außerdem wurden die Ligationen mit dem Rapid DNA Ligation Kit® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) laut Herstelleranweisung durchgeführt.

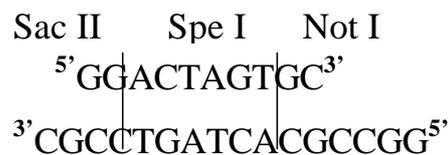
#### 4.7.2.6 Oligo-Herstellung

Zur Einführung der Restriktionsenzym-Schnittstellen Swa I, Spe I und Mlu I in die Plasmide wurden kleine Oligos mit den entsprechenden Sequenzen bei der Firma MWG (Ebersberg) oder an der Emory Universität (biochemical facility) in 5' Orientierung und das passende Gegenstück in 3' Orientierung bestellt. Zur Dimerisierung wurden je 1 ng/μl der Einzelstränge für 10 min bei 65 °C aneinander gebunden. Alle verwendeten Oligos sind im Folgenden abgebildet.

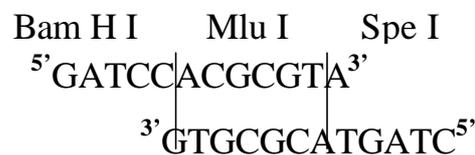
Sse-Swa-Mlu-Oligo



Sac-Spe-Not-Oligo



Bam-Mlu-Spe-Oligo



#### 4.7.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Das Prinzip der Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) (150) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 95 °C

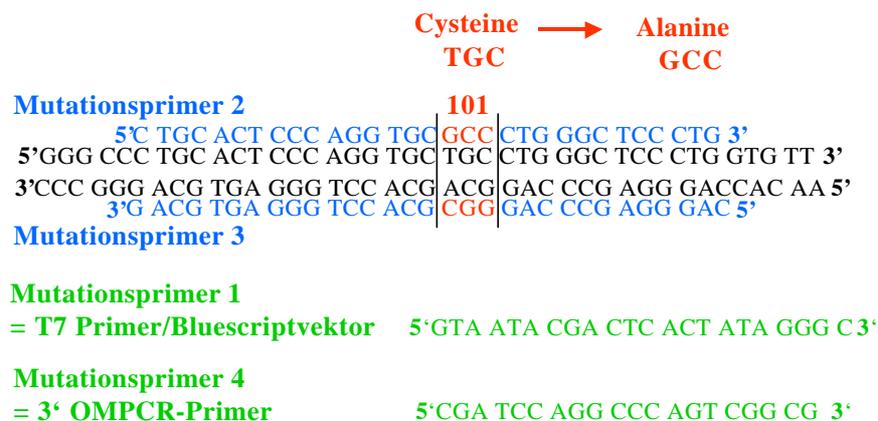
denaturiert. Die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge wird bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur des Oligonucleotids durchgeführt und liegt in einem Bereich von 50-65 °C. Es folgt die DNA Synthese bei 72 °C mit einer Polymerase. Diese Temperaturabfolge wiederholt sich in 20-40 Zyklen. Somit können selbst Spuren von DNA amplifiziert und nachgewiesen werden.

Je nach PCR wurden 1 pg –1 µg DNA und die Oligonucleotid-Primer (MWG, Ebersberg) in der Konzentration von je 10 pmol mit der entsprechenden Menge Wasser zu den Ready-To Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben, die 2,5 Units der thermostabilen puReTaq™-Polymerase enthalten.

Die Temperatur-Zyklen wurden im Mastercycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA im Agarose-Gel getrennt und isoliert.

#### 4.7.2.8 Einführung einer Mutation in die cDNA der bovinen eNOS (Primer-Overlap-Extension-PCR)

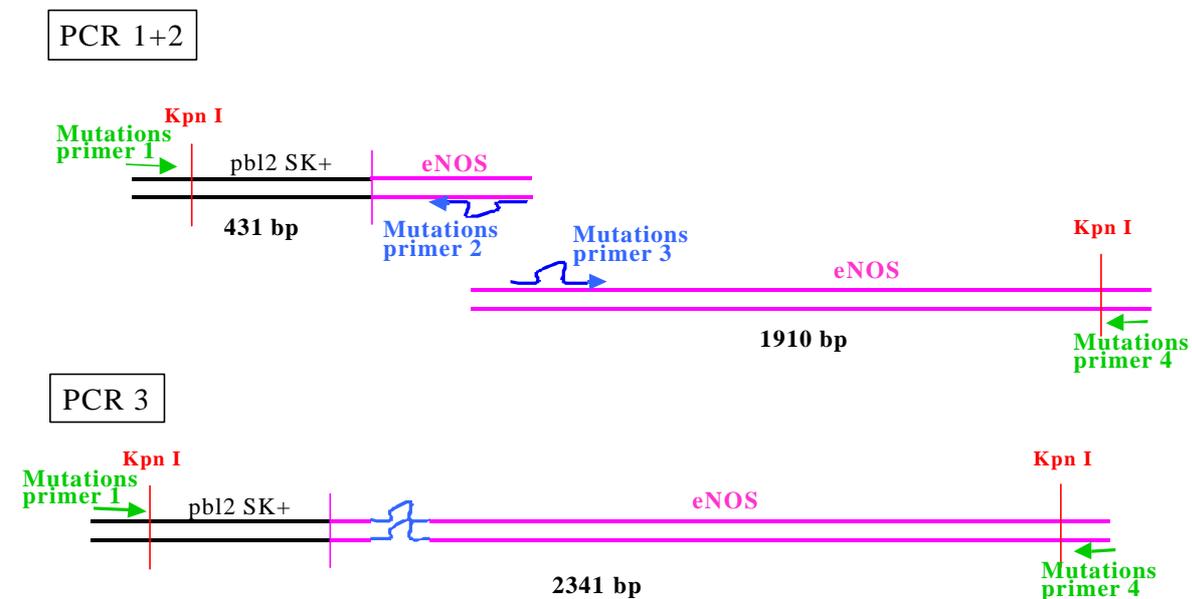
Die Mutation an der bovinen eNOS wurde mit einer speziellen Variation der PCR, der Primer-Overlap-Extension-PCR durchgeführt. Das zugrundeliegende Plasmid mit der bovinen eNOS war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Dr. David Harrison, Atlanta, GA, USA. Bei dieser Methode wurden 4 Primer entworfen. Zwei Primer enthielten die Mutation und überlappten sich in ihrer Sequenz:



**Abb. 16:** Dargestellt sind die sich überlappenden Mutationsprimer 2 und 3, die sich in nur 2 Basen von der ursprünglichen Sequenz der bovinen eNOS unterscheiden; unten sind die äußeren Mutationsprimer 1 und 4 angegeben.

Der Basenaustausch von TG zu GC in Position 301/302 (ausgehend vom ATG) der bovinen eNOS wurde so gewählt, dass es zu einer Veränderung des codierenden Triplets kam und die Aminosäure Cystein 101 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Als Mutationsprimer 1 wurde der T7 Primer des Bluescript Vektors (pbl2 SK+) benutzt und der Mutationsprimer 4 wurde so gewählt, dass er sich hinter der Kpn I Schnittstelle in der bovinen eNOS anlagert. In der ersten und zweiten PCR (Tab. 2.7.2.8) wurden also 2 DNA-Fragmente amplifiziert (Abb. 17). Das eine Stück war 431 Basenpaare (bp) lang und das andere Fragment 1910 bp. Beide DNA-Teilstücke stimmten in der Sequenz der Mutationsprimer überein. Die beiden PCR-Produkte wurden aus einem Agarose-Gel isoliert, gereinigt und dienten in der PCR 3 als Template.



**Abb. 17:** Prinzip der Primer-Overlap-Extension PCR. Mit 4 Primern wurden 2 DNA-Fragmente amplifiziert, die als Überhang die Mutation enthielten. In der 3. PCR wurden die beiden Teilfragmente nur mit den äußeren Primern (1 + 4) zu einem Stück zusammengefügt.

Bei der PCR 3 wurden nur der Mutationsprimer 1 und 4 zugegeben. Da sich die Sequenzen der Mutationsprimer 2 und 4 überlappten, wurde hier nur ein DNA-Fragment amplifiziert, das dann die Gesamtlänge von 2341 bp hatte. Die äußeren Primer waren extra vor, bzw. hinter die Kpn I Schnittstellen gelegt worden, so dass das Fragment nach der Isolation aus dem Gel mit Kpn I geschnitten werden konnte.

Zur Überprüfung der Mutation wurde das DNA-Fragment sequenziert.

	PCR 1	PCR 2	PCR 3
Template	Bovine eNOS im Bluescript Vektor  1 µg	Bovine eNOS im Bluescript Vektor  1 µg	Fragment 1 und 2 von PCR 1 und 2  1 µg
5'-Primer	Mutationsprimer 1  10 pmol	Mutationsprimer 3  10 pmol	Mutationsprimer 1  10 pmol
3'-Primer	Mutationsprimer 2  10 pmol	Mutationsprimer 4  10 pmol	Mutationsprimer 4  10 pmol
Q-Solution®	5 µl	5 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl

**Tab. 1:** Zusammensetzung der verschiedenen PCR-Ansätze zur Einführung einer Mutation in die cDNA der bovinen eNOS mit Primer-Overlap-Extension-PCR.

Alle drei PCRs wurden mit folgendem Programm im Mastercycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

- |             |       |       |                                   |
|-------------|-------|-------|-----------------------------------|
| 1. Schritt: | 95 °C | 5 min |                                   |
| 2. Schritt: | 95 °C | 30 s  | insgesamt wurden 35 Zyklen ab dem |
| 3. Schritt: | 56 °C | 1 min | 2. Schritt durchgeführt           |
| 4. Schritt: | 72 °C | 2 min |                                   |

#### 4.7.2.9 Etablierung einer PCR zur Genotypisierung der transgenen Tiere

Um die geplanten transgenen Tiere mit dem Tie-2-Promotor-eNOS-Konstrukt (siehe Ergebnisse, 3.5 und 3.6) genotypisieren zu können, wurde eine PCR entwickelt. Zur spezifischen Charakterisierung wurden folgende Primer gewählt:

5' Primer im Tie 2 Promotor

5'-GGG AAG TCG CAA AGT TGT GAG TT-3'

+ 3' Primer 311 in der eNOS

5'-CAC CAG GGA GCC CAG GCA GCA CCT GGG AGT GCA G-3'

→ 90 bp im Tie 2 Promotor bis zur Swa I Schnittstelle  
345 bp in der eNOS  
= 435 bp Fragment

+ 3' Primer 261 in der eNOS

5'-GCT CCC AGT TCT TCA CGC GAG G-3'

→ 90 bp im Tie 2 Promotor bis zur Swa I Schnittstelle  
261 bp in der eNOS  
= 351 bp Fragment

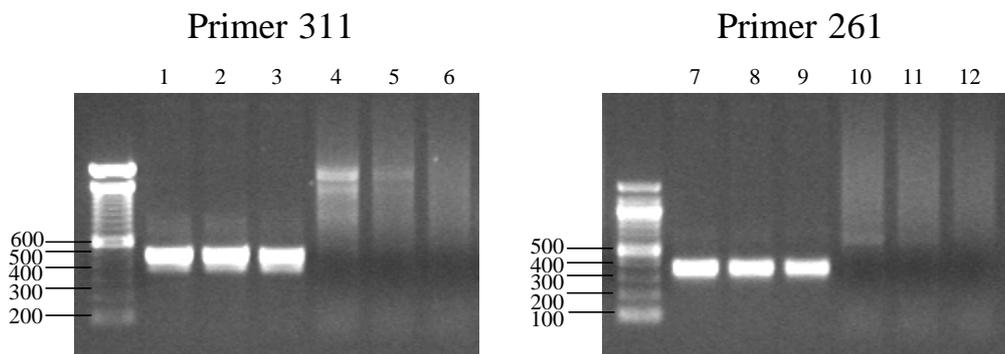
**Abb. 18:** Zur Genotypisierung von *TgN(Tie2eNOS)GK* entworfene Primer.

Der 5' Primer lagerte sich im Tie-2-Promoter 90 bp vor der eingefügten Swa I Schnittstelle an (siehe Ergebnisse, 3.5.1). Dann wurden zwei 3' Primer getestet, die sich beide in der eNOS an die cDNA anlagern. Der Primer 311 ließ somit ein Fragment mit 435 bp entstehen und der Primer 261 führte nach der PCR zu einem 351 bp großen Produkt. Die PCR wurde im Mastercycler Gradient<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt mit folgendem Programm:

- |             |                              |       |
|-------------|------------------------------|-------|
| 1. Schritt: | 95 °C                        | 5 min |
| 2. Schritt: | 95 °C                        | 45 s  |
| 3. Schritt: | Temperatur-Gradient 50-56 °C | 1 min |
| 4. Schritt: | 72 °C                        | 2 min |

insgesamt 35 Zyklen ab dem 2. Schritt.

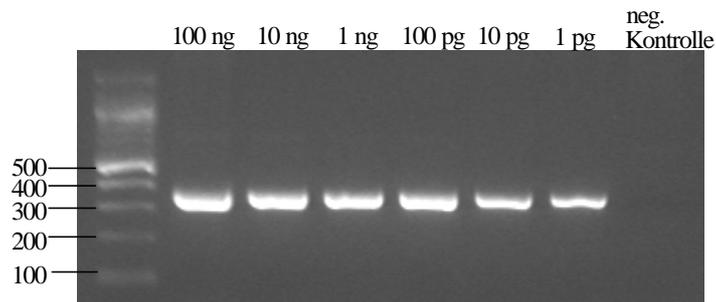
Mit der Einstellung des Temperatur-Gradienten war es möglich, mehrere PCR Ansätze bei verschiedenen Temperatur zu testen, da die optimale Anlagerungstemperatur der Primer ermittelt werden sollte. Als DNA wurden 100 ng Plasmid, bzw. 1 µg genomische Maus DNA (bereits aufgearbeitet in dieser Arbeitsgruppe aus C57BL/6-Mäusen) eingesetzt. In jeden Ansatz wurden noch die Primer in den Konzentrationen von je 10 pmol und 5 µl Q-Solution® (Qiagen, Hilden) zu den Ready-To Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben und dann mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt.



**Abb. 19:** Unter UV-Licht dargestellte PCR-Produkte (je 5 µl) im Agarose-Gel mit den Primern 311 und 261. **Spur 1-3, 7-9:** Tie-2-eNOS-Plasmid als Template bei den Temperaturen 50 °C, 53 °C, 55° C; **Spur 4-6, 10-12:** genomische C57BL6-Maus-DNA als Template bei gleichen Temperaturen.

Die beiden getesteten 3' Primer 311 und 261 ließen in den PCR-Ansätzen mit dem Tie-2-eNOS-Plasmid als Template bei jeder Temperatur Fragmente der richtigen Größe entstehen. Die Bande des 435 pb Fragmentes des Primers 311 war allerdings verschwommen. Daher wurde der Primer 261 mit seiner klaren Bande bei 351 bp zur späteren Genotypisierung ausgewählt. Eine Temperatur von 54 °C wurde als günstigste Anlagerungstemperatur der Primer gewählt. Beide Primer zeigten keine Produktbildung in genomischer C57BL/6-Maus-DNA, was für die spezifischen Identifizierung des Transgens wichtig ist.

Da bei einer Genotypisierung sehr geringe Mengen Transgen nachweisbar sein müssen, wurde das Tie-2-eNOS-Plasmid bis zu einer Konzentration von 1 pg verdünnt, denn mind. 10 pg Plasmid-DNA müssen eine deutliche Bande zeigen, sonst ist die Genotypisierung nicht sicher. Das Tie-2-eNOS-Plasmid wurde in den Verdünnungen 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg und 1pg in der PCR eingesetzt, die wie oben beschrieben mit dem Primer 261 mit einer Temperatur von 54 °C zur Anlagerung der Primer durchgeführt wurde.



**Abb. 20:** *Abhängigkeit der Genotypisierung von der Konzentration des eingesetzten Tie-2-eNOS-Plasmides. Die unter UV-Licht dargestellten PCR Produkte im Agarose Gel (5µl) hatten alle die gewünschte Größe von 351 bp. Bei 1 ng Template war immer noch eine deutliche Bande zu erkennen, die als neg. Kontrolle aufgetragene genom. Maus DNA zeigte kein PCR Produkt.*

Selbst bei Zugabe von 1 pg Tie-2-eNOS-Plasmid in den PCR-Ansatz ist im Gel noch eine deutliche 351 bp große Bande zu sehen. Die genomische C57BL/6 Maus-DNA zeigte als Negativkontrolle keine Produktbildung.

#### 4.7.2.10 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden im Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, oder in der Emory University, Atlanta durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Prinzip von Sanger (1977) unter Verwendung von "Dye Terminatoren" vorgenommen. Das sind Didesoxynukleotide (ddNTPs), markiert mit Rhodamin Farbstoffen. Es wurde eine PCR durchgeführt, bei der die Plasmid-DNA mit dem entworfenen 5'-Primer, normalen dNTPs und den gefärbten ddNTPs bei niedriger Temperatur (50-55 °C) amplifiziert wurde. Die eingesetzten ddNTPs unterscheiden sich von den Desoxynukleotiden (dNTPs) durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe. Beim Einbau von Didesoxynukleotiden in die DNA, kann sich kein weiteres Nucleotid anhängen und es kommt zum Abbruch der DNA-Synthese. Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente gefällt und mit speziellem Auftragspuffer auf ein Gel geladen. Der Gellauf wurde in dem ABI Prism 377<sup>TM</sup>-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Ein Laser regte die Rhodaminfarbstoffe während des Gellaufes an und mit speziellen Filtern wurden die Spektren der markierten ddNTPs im Computer aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte mit der Sequencing Analysis Software<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Version 3.4.1) unter Verwendung einer auf die Dye Terminatoren abgestimmten Matrix. Die erhaltenen Sequenzen (siehe Ergebnisse, Abb. 36) wurden mit den publizierten Sequenzen verglichen und mit dem Gene-Runner<sup>®</sup> Programm (Version 3.05, Hastings Software Inc., 1994) ausgewertet und bearbeitet.

### 4.8 DNA-Mikroinjektion

Die DNA-Mikroinjektion und Implantation der Embryonen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Rütter, Institut für Entwicklungsbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Das Tie-2-eNOS-Plasmid (siehe Ergebnisse, 3.5.3) wurde mit Sal I verdaut und so von Vektoranteilen befreit. Die linearisierte DNA, die nun aus Tie-2-Promotor-eNOS-Tie-2-Enhancer bestand, wurde in den männlichen Vorkern befruchteter Eier injiziert. Die Isolierung befruchteter Eier erfolgte aus jungfräulichen weiblichen Tieren, die vier bis fünf Wochen alt waren und durch Hormon Behandlung zur Zyklus-Ovulation angeregt wurden. Die Weibchen wurden mit männlichen Tieren gepaart und am folgenden Tag die befruchteten Eier aus den Ovidukten entnommen. Die Zygoten wurden von anhaftenden Zellen befreit und mit einer Halte-Pipette fixiert. Mit einer Mikroinjektionspipette und einem Mikromanipulator wurde eine geringe Menge Tie-2-eNOS in den männlichen Vorkern injiziert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde das Embryo, das mittlerweile im Zwei-Zell-Stadium war, in das Ovidukt scheinchwangerer Weibchen transplantiert. Nach 3 Wochen wurde die erste Generation geboren, die man auch Founder Generation (F<sub>0</sub>) nennt. Die Tiere wurden mit der Genotypisierung auf die Aufnahme des Transgens hin getestet und gegebenenfalls zur Zucht eingesetzt.

### 4.9 Statistik

Zur Bestimmung der Wirkstärke der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden nach den Ergebnissen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven die halbmaximal wirksamen Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) errechnet. Im Fall der konzentrationsabhängigen Steigerung der Aktivität der isolierten löslichen Guanylatzyklase und der bovinen eNOS wurden deren spezifische Aktivitäten in pmol/mg Protein/min zugrundegelegt. Hierbei entspricht die  $EC_{50}$  derjenigen Konzentration einer Wirksubstanz, die eine halbmaximale Stimulation der Enzymaktivität auslöst.

Alle biochemischen und funktionellen Messdaten sind als arithmetischer Mittelwert ( $\pm$  SEM, Standardfehler des Mittelwertes) ausgedrückt. Im Fall nicht normalverteilter Messwerte wurde der Median berechnet. Alle Daten wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test oder mit einem zweiseitigen Student-t-Test analysiert. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl der Versuche ist mit n bezeichnet.

## **5 ERGEBNISSE**

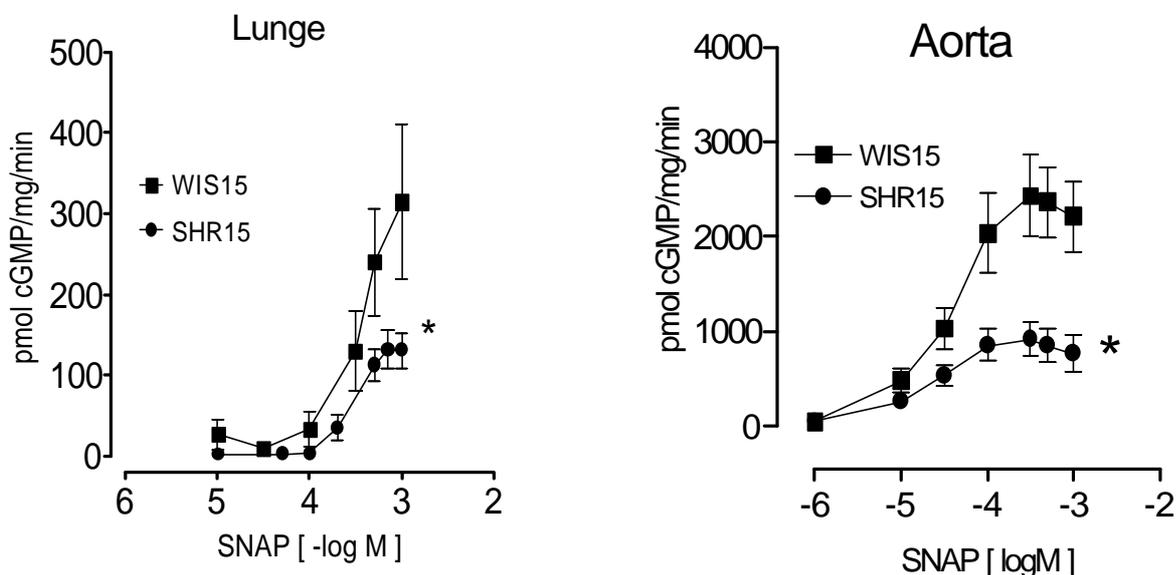
---

## 5.1 Untersuchungen zum Mechanismus der endothelialen Dysfunktion am Beispiel der Hypertonie

Die Hypertonie diente als Modell für Untersuchungen zum Mechanismus der endothelialen Dysfunktion, weil sie mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasorelaxation einhergeht (80).

### 5.1.1 Auswirkungen der Hypertonie auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase

Die Aktivität der isolierten löslichen Guanylatzyklase (sGC) wurde in zytosolischen Präparationen aus Lungen- und Aortengewebe von 15 Monate alten normalen Ratten (WIS15) und gleichaltrigen spontan-hypertensiven Ratten (SHR15) geprüft. Die Aktivierbarkeit der sGC mit dem  $\text{NO}^\bullet$ -Donator SNAP war in den Präparationen aus SHR15 signifikant erniedrigt (Abb. 21).



**Abb. 21:** Die spezifische Aktivität der isolierten sGC aus Lungen (links,  $n=6$ ) und Aorten (rechts,  $n=7$ ) von WIS15 und SHR15. In beiden Gewebearten der WIS15 Tiere konnte eine signifikant höhere maximale cGMP Produktionsrate gemessen werden. Dies verdeutlicht die Erniedrigung der Aktivität vaskulärer sGC in hypertensiven Ratten.

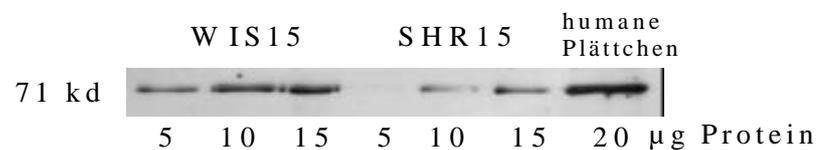
Die maximale Produktionsrate von cGMP war in der sGC isoliert aus Aortenringen der SHR15 Tiere signifikant höher als die der Kontrolltiere (WIS15:  $2430 \pm 430$  pmol cGMP/mg/min; SHR15:  $919 \pm 179$  pmol cGMP/mg/min;  $n=7$ ;  $P < 0,001$ ). Die Sensitivität der sGC in diesen Gruppen gegenüber  $\text{NO}^\bullet$  war allerdings durch die Hypertonie nicht verändert. Das konnte gezeigt werden, indem die halbmaximalen Aktivierungen bei gleicher SNAP-Konzentration verglichen wurden ( $\text{EC}_{50}$  in  $-\log\text{M}$ ; WIS15:  $4,5 \pm 0,2$ ; SHR15:  $4,7 \pm 0,3$ ). Die Untersuchung der Rattenlungen-sGC lieferte ähnliche Ergebnisse. Auch in den Lungen war die maximale cGMP-Produktionsrate der sGC der normotensiven Tiere mit  $314 \pm 95$  pmol cGMP/mg/min signifikant höher als die cGMP-Produktion in den hypertensiven Ratten ( $131 \pm 21$  pmol cGMP/mg/min:  $P < 0,05$ ). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert bei den WIS15 war mit  $3,4 \pm 0,1 -\log\text{M}$  gleich dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert der SHR15 ( $3,5 \pm 0,1 -\log\text{M}$ ;  $P = 0,476$ ).

Bei dem Rattenmodell zur essentiellen Hypertonie zeigte sich somit eine ausgeprägte Erniedrigung der sGC-Aktivität in Aorten und Lungen, aber keine Einschränkung der Sensitivität der löslichen Guanylatzyklase gegenüber dem  $\text{NO}^\bullet$ -Donator SNAP.

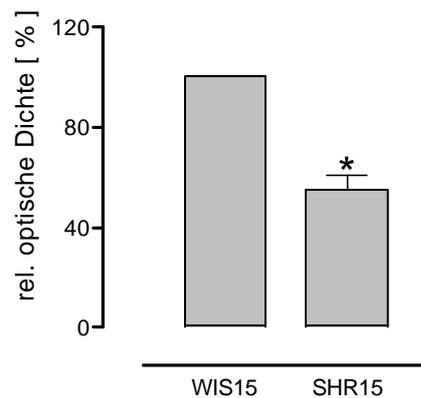
### 5.1.2 Auswirkungen der Hypertonie auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase

Eine Ursache für die geringere sGC-Aktivität bei Hypertonie könnte eine verminderte Expression des Proteins sein. Anhand von Western Blots wurde somit die Expression der sGC in den Aortenringen der WIS15 und SHR15 untersucht.

A



B



**Abb. 22:** A: Repräsentativer Western Blot für die Expression der sGC aus Aorten der WIS15 und SHR15, detektiert mit einem Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit des Enzyms. Als Standard diente eine sGC-Präparation aus humanen Thrombozyten. B: Ergebnis der densitometrischen Analyse von insgesamt 6 Western Blots. (\* =  $P < 0,01$ )

Mit einem Antikörper, der gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC gerichtet war, konnte die Expression der Guanylatzyklase in den zytosolischen Fraktionen der Aortenringen von WIS15 und SHR15 verglichen werden. Die als Standard verwendete sGC-Präparation aus humanen Thrombozyten zeigte die richtige Bandenhöhe von 71 Kilodalton (kD) an. Die Auswertung von insgesamt 6 Western Blots ergab eine signifikant geringere Expression der sGC bei hypertensiven Ratten ( $P < 0,01$ ). Sie betrug nur  $45,6 \pm 5,3$  % der Expression der sGC von normotensiven WIS15-Tieren.

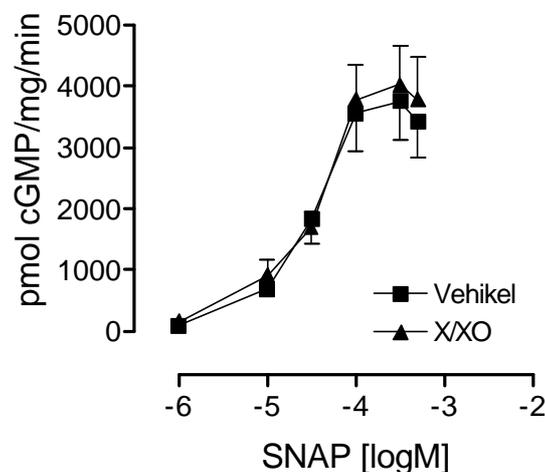
## 5.2 Untersuchungen zum Einfluss von Radikalen auf die Aktivität und Expression löslicher Guanylatzyklase

Die oben genannten Ergebnisse weisen auf eine deutliche Beteiligung einer gestörten  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$ -Signaltransduktion am molekularen Mechanismus der endothelialen Dysfunktion bei Hypertonie hin. Da gezeigt werden konnte, dass die Hypertonie ebenfalls mit einer drastischen Erhöhung der vaskulären Bildung von Superoxidradikalen einhergeht, lag nahe zu untersuchen, ob die gefundene Erniedrigung der sGC Aktivität und Expression kausal mit der Radikalbildung verknüpft ist. Somit wurde der Einfluss von  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und deren Reaktionsprodukt Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) auf den vaskulären  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$ -Signaltransduktionsweg untersucht.

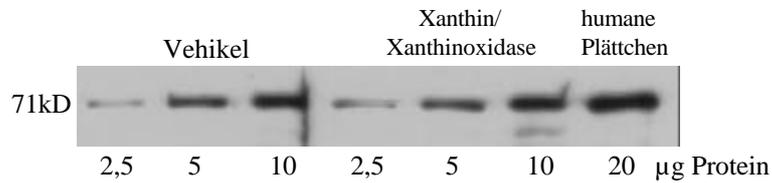
### 5.2.1 Einfluss extrazellulärer Superoxidradikale auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase

Die Inkubation von Aortenringen 4 Monate alter Wistar-Ratten mit  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , freigesetzt aus dem System 48 x 200  $\mu\text{M}$  Xanthin und 14,4 U/l Xanthinoxidase in oxygeniertem Krebs-Henseleit Puffer für 4 h, hatte keinen Einfluss auf die Aktivität und Expression der isolierten löslichen Guanylatzyklase.

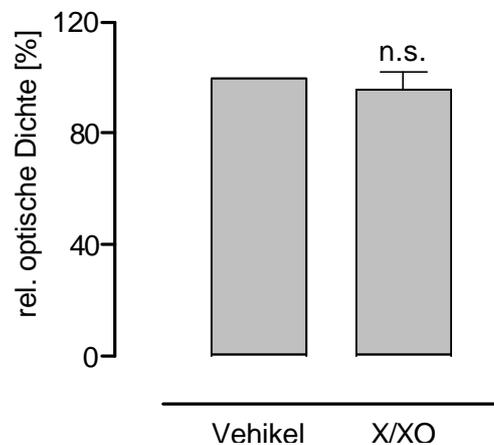
A



B



C

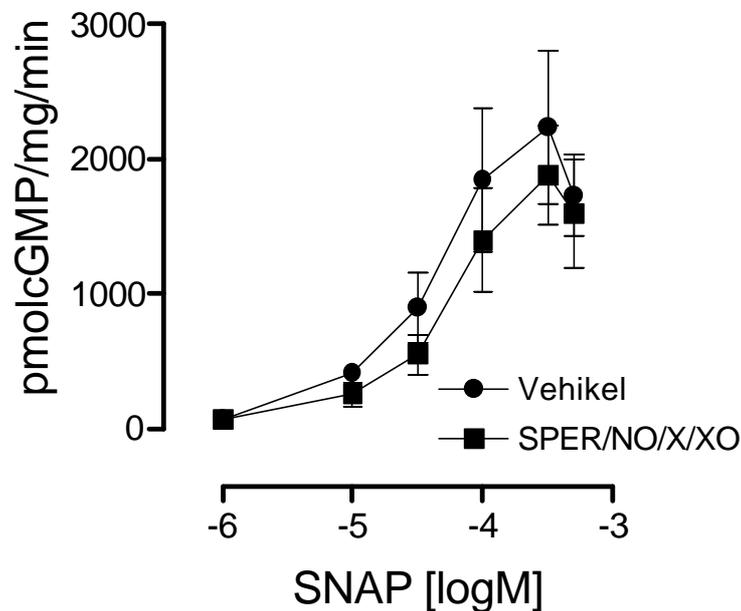


**Abb. 23:** *A: Spezifische Aktivität der sGC; B: Repräsentativer Western Blot der sGC-Expression; C: Densitometrische Auswertung von insgesamt 6 Western Blots. Die Aortenringe wurden für 4 h mit Vehikel oder 48 x X/XO inkubiert und zeigten keinen Unterschied in ihrer Aktivität oder Expression (n.s.,  $P > 0,05$ ).*

Es konnte kein Unterschied in der Aktivität der löslichen Guanylatzyklase durch eine deutliche Erhöhung der extrazellulären Superoxid-Konzentration festgestellt werden (Abb. 23). Die maximalen cGMP-Produktionsraten der sGC aus  $O_2^{\bullet-}$ -behandelten und nicht behandelten Aortenringen waren gleich groß. Auch bei der Überprüfung der Expression der sGC aus denselben Aorten wurde kein Unterschied zwischen Vehikel- oder  $O_2^{\bullet-}$ -Inkubation festgestellt.

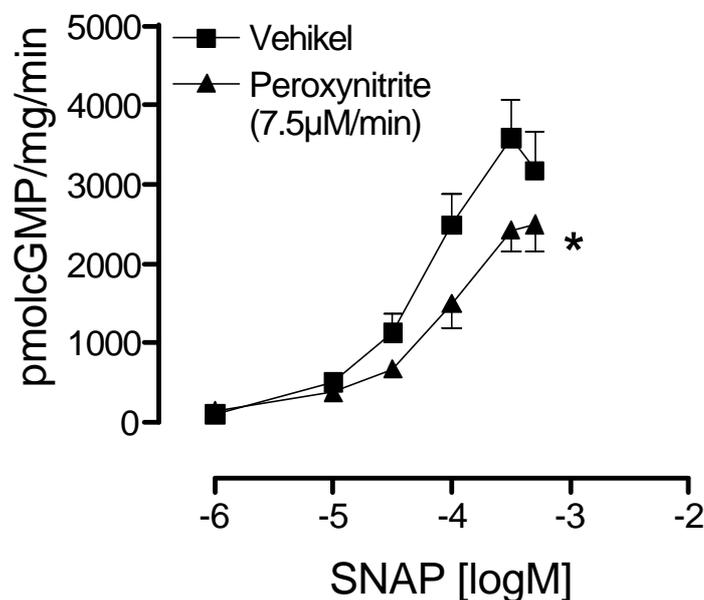
### 5.2.2 Einfluss von extrazellulärem Peroxynitrit auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase

Bei den Inkubationen mit extrazellulär gebildetem Peroxynitrit, bei denen mit SPER/NO/X/XO (200  $\mu\text{M}/1 \times 400 \mu\text{M} + 5 \times 200 \mu\text{M}/14,4 \text{ U/l}$ ) inkubiert wurde, konnte kein Unterschied in der Aktivität der sGC gefunden werden (Abb. 24). Die extrazellulär gebildete niedrige Dosis ONOO<sup>•</sup> von 0,13  $\mu\text{M}/\text{min}$  veränderte die cGMP-Produktionsrate der mit behandelten Aorten nicht gegenüber den Vehikel-inkubierten Ringen.



**Abb. 24:** Aktivität der löslichen Guanylatzyklase isoliert aus Aortenringen inkubiert mit SPER/NO/X/XO ( $n=6$ ). Die aus diesem System freigesetzte Menge Peroxynitrit (0,13  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) hatte keinen Einfluss auf die cGMP-Produktionsrate.

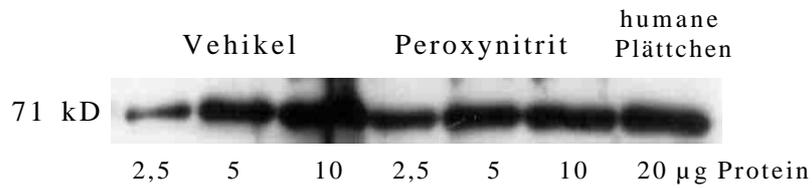
Daher wurden bei einer weiteren Versuchsreihe die Rattenaorten mit dem System SPER/NO/Lumazin/XO (200  $\mu\text{M}$ /3 x 1 mM/58 U/l) für 4 h inkubiert. Die hier extrazellulär gebildete Menge an  $\text{ONOO}^{\bullet}$  von 7,5  $\mu\text{M}/\text{min}$  führte zu einer signifikanten Erniedrigung ( $P=0,036$ ,  $n=5$ ) der maximalen cGMP-Bildungsrate bei den mit  $\text{ONOO}^{\bullet}$  inkubierten Aorten (3579 $\pm$ 495 pmol cGMP/mg/min) im Vergleich zu Vehikel-inkubierten Geweben (2422 $\pm$ 265 pmol cGMP/mg/min) (Abb. 25).



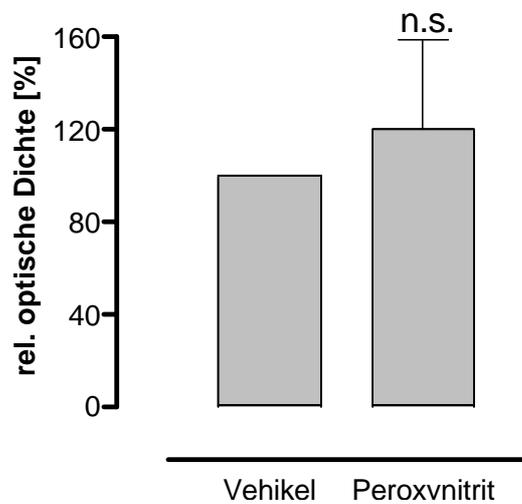
**Abb. 25:** Spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase inkubiert mit Peroxynitrit (7,5  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) oder Vehikel. Die maximale cGMP-Bildungsrate der mit Peroxynitrit inkubierten Aorten war mit 3579 $\pm$ 495 pmol cGMP/mg/min signifikant geringer (\*,  $P=0,036$ ,  $n=5$ ) als die der Vehikel inkubierten Gewebe mit 2422 $\pm$ 265 pmol cGMP/mg/min.

Da eine hohe Dosis extrazellulär gebildeten Peroxynitrits die Aktivität der sGC veränderte, wurde in den zytosolischen Fraktionen der mit 7,5  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit/min oder Vehikel inkubierten Rattenaorten die Expression der sGC mit Western Blots untersucht.

A



B



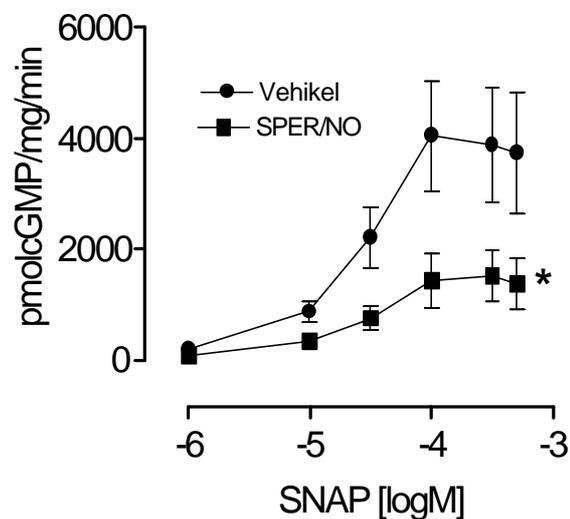
**Abb. 26:** *A: Repräsentativer Western Blot von der sGC, inkubiert mit einer hohen Dosis extrazellulären Peroxynitrits oder Vehikel. B: Auswertung von insgesamt 4 Western Blots. Die Expression der sGC wurde durch die Inkubation mit 7,5 µM Peroxynitrit/min für 4 h nicht signifikant verändert (n.s.,  $P > 0,05$ ).*

Die densitometrische Analyse von insgesamt 4 Western Blots zeigte keinen Unterschied in der sGC-Expression durch extrazelluläres ONOO<sup>-</sup> (Abb. 26).

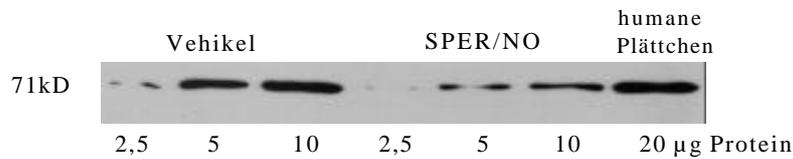
### 5.2.3 Einfluss von NO<sup>•</sup> auf die Aktivität und Expression isolierter löslicher Guanylatzyklase

Der Einfluss einer Inkubation mit nur 200  $\mu\text{M}$  SPER/NO auf die Aktivität und Expression der sGC wurde zur Kontrolle durchgeführt. Es sollte der Effekt einer steady-state-Konzentration von ca. 2  $\mu\text{M}$  NO<sup>•</sup> (siehe Methoden, Abb. 6) mit den Auswirkungen von O<sub>2</sub><sup>•</sup> und ONOO<sup>•</sup> auf die sGC verglichen werden. Die Aktivität der sGC wurde durch die Inkubation mit NO<sup>•</sup> drastisch gesenkt. Die maximale cGMP-Bildungsrate lag bei den behandelten Aorten nur noch bei 1429 $\pm$ 491 pmol cGMP/mg/min gegenüber 4041 $\pm$ 992 pmol cGMP/mg/min bei den nicht behandelten Aorten (Abb. 27). Dieser signifikante Unterschied in der Aktivität ( $P < 0,0001$ ,  $n=6$ ) zeigte sich jedoch nicht in der Sensitivität des Enzyms gegenüber dem NO<sup>•</sup> Donator SNAP. Die EC<sub>50</sub> (in  $-\log\text{M}$ ) beider Inkubationen waren gleich: Vehikel 4,55 $\pm$ 0,21 und SPER/NO 4,49 $\pm$ 0,27.

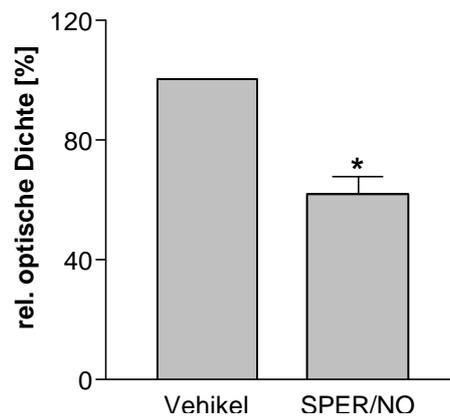
A



B



C



**Abb. 27:** *A: Spezifische Aktivität der sGC nach Inkubation mit  $2\ \mu\text{M NO}$ , B: repräsentativer Western Blot der Expression der sGC, C: Analyse von insgesamt 5 Western Blots. Die Aktivität und Expression der sGC ist durch eine Inkubation mit  $\text{NO}$  signifikant erniedrigt (\*,  $P=0,0001$ ).*

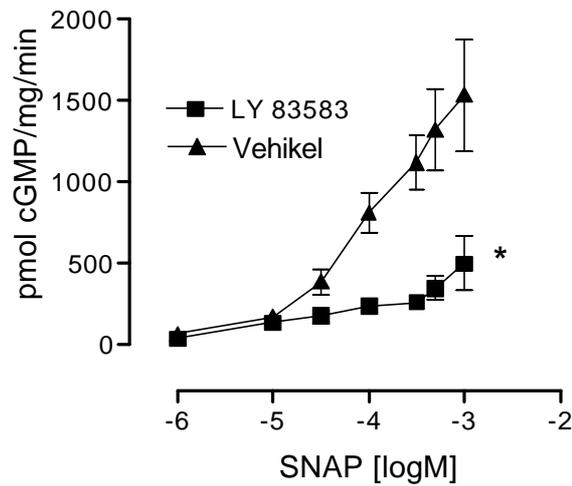
Der drastische Einfluss von  $\text{NO}^\bullet$  auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase spiegelte sich auch in der Expression wieder. Durch eine Inkubation mit  $\text{NO}^\bullet$  wurde also die Expression der sGC deutlich erniedrigt ( $P=0,0001$ ,  $n=5$ ). Bei einer Inkubation mit  $\text{NO}^\bullet$  kam es demnach möglicherweise zur Rückkopplungshemmung auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase. Bei den Inkubationen mit Peroxynitrit spielt eine solche Rückkopplungsregulation wahrscheinlich keine Rolle, denn obwohl die Aktivität der sGC erniedrigt war, wurde die Expression des Proteins nicht verändert.

#### 5.2.4 Einfluss intrazellulärer Superoxidradikale auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase

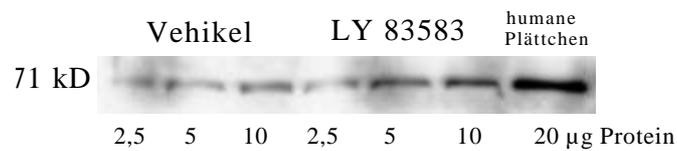
Bei den bisherigen Inkubationsversuchen wurden die Radikale extrazellulär gebildet. Mit der Substanz LY 83583, die in den Zellen  $\text{O}_2^{\bullet-}$  entstehen lässt, sollte nun der Einfluss von intrazellulär gebildeten  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikalen untersucht werden. LY 83583 steigert die

Radikalbildung isolierter Rattenaortenringe (in counts/mg) von  $78 \pm 4$  auf  $147 \pm 18$  ( $P=0,0208$ , (88)). Die Aorten von 4 Monate alten Wistar Ratten wurden daher für 4 h mit  $10 \mu\text{M}$  LY 83583 in oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

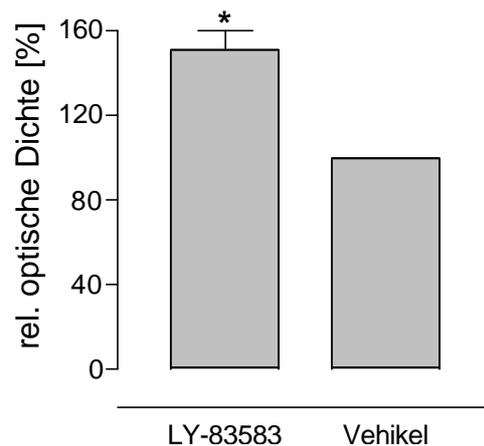
A



B



C



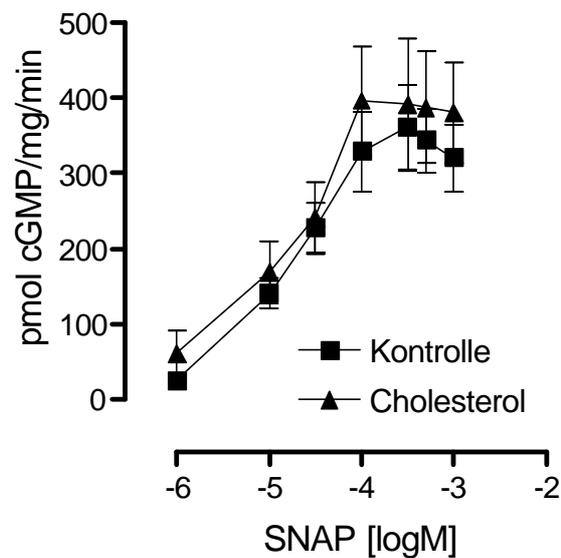
**Abb. 28:** **A:** Spezifische Aktivität der sGC in Rattenaorten, inkubiert mit  $10 \mu\text{M}$  LY 83583 für 4 h. Die Aktivität in den mit  $\text{O}_2^-$  inkubierten Geweben war signifikant geringer, als die der mit Vehikel inkubierten sGC (\*,  $P < 0,0001$ ,  $n=5$ ); **B:** Repräsentativer Western Blot für die  $\alpha_1$  Untereinheit der sGC; **C:** Densitometrische Auswertung von insgesamt 5 Blots, die Inkubation mit intrazellulärem  $\text{O}_2^-$  erhöhte die Expression der sGC deutlich (\*,  $P < 0,01$ ).

Die Inkubation mit intrazellulär gebildetem  $O_2^{\bullet-}$  aus LY 83583 hatte eine drastische Erniedrigung der spezifischen Aktivität der sGC zur Folge ( $P < 0,0001$ ,  $n=5$ ) (Abb. 28). Die maximale cGMP-Produktionsrate in Vehikel inkubierten Geweben betrug  $1536 \pm 344$  pmol cGMP/ mg/min gegenüber nur  $500 \pm 168$  pmol cGMP/mg/min in den mit LY 83583 behandelten Aortenringen. Bei der Untersuchung der Expression der sGC mit dem Antikörper gegen die  $\alpha_1$  Untereinheit zeigte sich bei insgesamt 5 Western Blots eine verstärkte Expression der sGC ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) bei den mit Radikalen inkubierten Geweben. Somit führten intrazellulär gebildete  $O_2^{\bullet-}$ -Radikale zu einer Erniedrigung der sGC Aktivität bei gleichzeitig erhöhter Expression des Proteins. Diese Ergebnisse deuten auf die Bildung einer dysfunktionalen löslichen Guanylatzyklase hin.

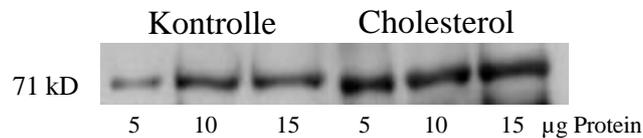
### 5.3 Auswirkungen der Atherosklerose auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase

Eine Hypercholesterolämie und die daraus resultierende Pathogenese der Atherosklerose sind wie auch die Hypertonie durch eine endotheliale Dyfunktion und erhöhte Radikalbildung gekennzeichnet. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, wie sich das Krankheitsbild der Atherosklerose auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase auswirkt. Den nach 16 Wochen Cholesterol-Diät (0,75 % Cholesterol im Standardfutter) hypercholesterolämischen Kaninchen (88) wurden die Aorten entnommen und zytosolische Fraktionen mit isolierter sGC präpariert. Die Aktivität und Expression der sGC wurde in diesen Präparationen getestet (Abb. 29).

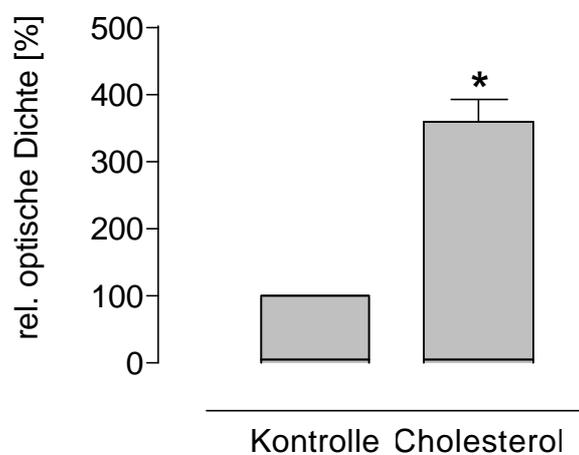
A



B



C



**Abb. 29:** *A: Spezifische Aktivität der sGC aus Kaninchenaorten normaler und hypercholesterolämischer Tiere, es konnte kein Unterschied in der Aktivität festgestellt werden. B: Repräsentativer Western Blot mit dem Antikörper gegen die  $\alpha_1$  Untereinheit der sGC; C: Densitometrische Auswertung von insgesamt 6 Western Blots; die Expression der sGC in den hypercholesterolämischen Kaninchen war drastisch erhöht (\*,  $P < 0.0001$ ).*

Bei der Bestimmung der sGC-Aktivität in Aorten der Kaninchen mit Hypercholesterolämie oder normalen Tieren, konnte kein Unterschied gefunden werden. Bei der Überprüfung der Expression der sGC konnte dann aber eine drastische Erhöhung sGC-Expression bei Hypercholesterolämie detektiert werden. Die densitometrische Auswertung ergab eine 3,6 fache Expression der Guanylatzyklase durch die Cholesterol Fütterung ( $P < 0,0001$ ,  $n=6$ ). Bei der Hypercholesterolämie scheint somit eine dysfunktionale sGC gebildet worden zu sein, denn obwohl die Expression der sGC stark erhöht war, blieb die spezifische Aktivität des Proteins unverändert.

Während bei der essentiellen Hypertonie die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase erniedrigt waren, so zeigte sich bei der Atherosklerose eine unveränderte sGC Aktivität bei stark erhöhter sGC-Expression. Den beiden Krankheitsmodellen liegt demnach ein unterschiedlicher Pathomechanismus zugrunde. Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass die essentielle Hypertonie sich durch eine Herunterregulation der löslichen Guanylatzyklase auf Proteinebene auszeichnet, was eine erniedrigte Aktivität des Enzyms zur Folge hat. Diese Ergebnisse konnten auch bei der Inkubation von gesunden Rattenaorten mit  $\text{NO}^\bullet$  beobachtet werden. Bei der Atherosklerose war die Expression der löslichen Guanylatzyklase deutlich erhöht, die spezifische Aktivität der sGC jedoch unverändert. Wenn mehr sGC exprimiert wurde, so hätte man eine erhöhte Aktivität erwartet. Daher scheint der Pathomechanismus bei der Atherosklerose auf die Bildung einer dysfunktionalen Guanylatzyklase zu beruhen. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit einer hohen Dosis extrazellulärem Peroxynitrit und intrazellulär gebildeter Radikale durch LY 83583 deuteten ja bereits auf die Bildung einer dysfunktionalen sGC hin. Da bei der Atherosklerose viele Faktoren das Krankheitsbild ausmachen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die erhöhte Radikalbildung alleine zu der gefundenen Einschränkung des  $\text{NO}^\bullet$ -Signaltransduktionsweges führt.

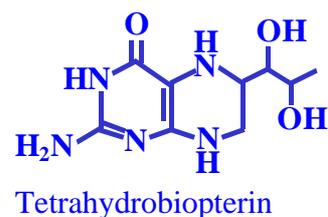
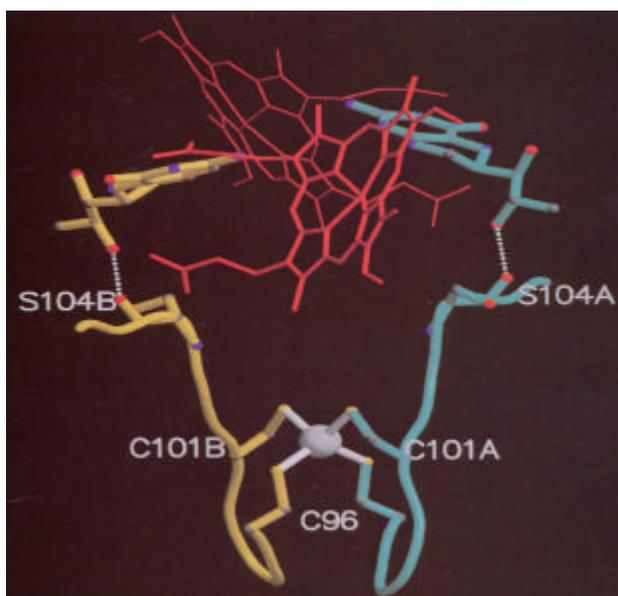
Deshalb sollte untersucht werden, welche Folgen eine gezielte Erhöhung der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikalbildung in vivo hat. Eine mögliche Radikalquelle in der Zelle könnte die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sein. Es gibt Hinweise in der Literatur, wo über eine „entkoppelte eNOS“ berichtet wird, die bei einem Mangel an ihrem Kofaktor Tetrahydrobiopterin Superoxidradikale bildet anstatt von  $\text{NO}^\bullet$  (174). Da die eNOS das  $\text{NO}^\bullet$  zur Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase liefert, könnte ein direkter Zusammenhang zwischen einer „entkoppelten eNOS“ und den gefundenen Ergebnissen zur Veränderung der sGC Aktivität und Expression bestehen.

Ziel war es, die eNOS so zu verändern, dass ihre Tetrahydrobiopterin- Bindung gestört wird und das Enzym fälschlicher Weise die Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikalen anstatt von  $\text{NO}^\bullet$  katalysiert.

## 5.4 Mutation und Entkopplung der endothelialen NO-Synthase

Durch Mutation der eNOS sollte ein Modell für eine Entkopplung des Enzyms etabliert werden. Es ist bekannt, dass die eNOS bei  $\text{BH}_4$ -Mangel in ihrer Funktion gestört ist und selbst  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und Wasserstoffperoxid anstatt  $\text{NO}^{\bullet}$  bildet (57;137;174). Es sollte also eine Mutante konstruiert werden, die eine eingeschränkte Affinität gegenüber  $\text{BH}_4$  aufweist, als Folge  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikale produziert, und gleichzeitig doch stabil genug ist, um deren Eigenschaften zu studieren.

Chen et al. (23) haben gezeigt, dass eine Mutation des Cystein 99 der humanen eNOS zu einer geringeren  $\text{BH}_4$ -Affinität, einer Enzyminstabilität und dem Verlust des Häm führt. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen eNOS, mit der bovinen eNOS (Rodriguez-Crespo, Biochemistry 1997, 36, 8530-8538), ergab sich, dass Cystein 101 der bovinen eNOS dem Cystein 99 der humanen eNOS entspricht. In der bovinen eNOS sind jeweils Cystein 96 und Cystein 99 der Monomere kovalent an ein Zink-Atom gebunden und bilden so eine tetrahedral koordinierten Zinkfinger aus (Abb. 30). In der Kristallstruktur der eNOS erkennt man, dass gerade diese vierfache Bindung der zwei Monomere zum Zink der eNOS die notwendige Stabilität gibt. In dieser räumlichen Anordnung bilden das Häm und der Kofaktor Tetrahydrobiopterin das katalytische Zentrum der eNOS.

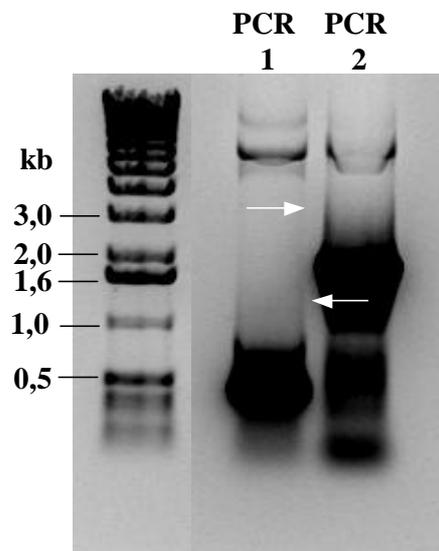


**Abb.30:** Computer-Darstellung der tetrahedralen Zinkbindung in der eNOS mit den bindenden Cysteinen 101 und 96; ein Monomer ist gelb, das andere blau dargestellt; in rot sind die Häm-Anteile eingefügt, daneben Tetrahydrobiopterin gebunden an Serin 104; (141)

Mit der Mutation des Cystein 101 zu Alanin wurden dem Zink zwei Liganden genommen. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die instabile Zinkbindung Auswirkungen auf die BH<sub>4</sub>-Affinität des Enzyms und seine katalytische Aktivität hat. Es sollte überprüft werden, ob eine solche eNOS tatsächlich entkoppelt und O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Radikale bildet.

#### 5.4.1 Herstellung des C101A-eNOS-Plasmides

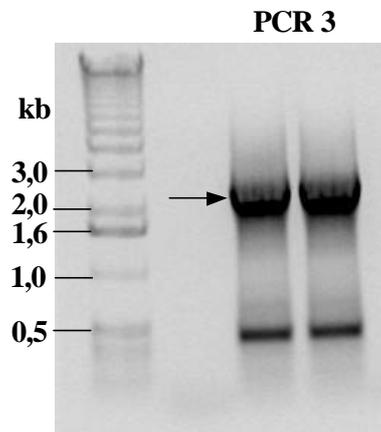
Wie schon in den Methoden beschrieben, wurde zur Einführung der Mutation in die eNOS eine Primer-Overlap-Extension-PCR-Methode durchgeführt. Zunächst wurde die PCR 1 und 2 durchgeführt und die Größe der Produkte in einem Agarose-Gel abgeschätzt.



**Abb. 31:** Die Produkte der PCR 1 und 2 in einem Agarose Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Fragmentgröße betrug bei der PCR 1 431 bp und bei der PCR 2 1910 bp.

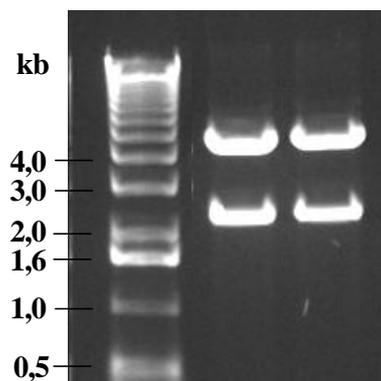
Die amplifizierten DNA-Fragmente hatten die gewünschten Größen von 431 bp bei der PCR 1 und 1910 bp für das Produkt der PCR 2 (siehe Methoden, 2.7.2.8).

Die beiden PCR Produkte wurden aus dem Gel isoliert und dann als Templates für die PCR 3 eingesetzt. Das DNA-Fragment der PCR 3 hatte die Größe von 2341 bp (Abb. 32), was der Summe beider eingesetzter Templates entspricht.



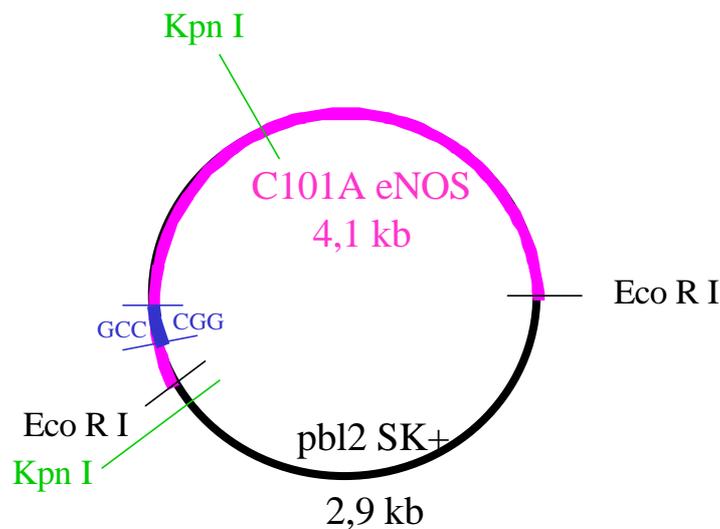
**Abb. 32:** Agarose-Gel mit dem Fragment der PCR 3. Die Bande zeigt die gewünschte Größe von 2341 bp (schwarzer Pfeil).

Das 2341 bp große Produkt der PCR 3 enthielt die Mutation, da sich die zuvor eingesetzten Mutationsprimer 3 und 4 überlagerten und beim Vervielfältigen der DNA in der PCR 3 zusammengesetzt wurden. Da die beiden äußeren Mutationsprimer 1 und 4, die bei der PCR 3 verwendet wurden beide eine Kpn I Schnittstelle enthielten, konnte nun das 2341 bp Fragment nach seiner Isolation aus dem Gel mit dem Enzym Kpn I geschnitten werden. Auch die bovine eNOS im Bluescript Vektor wurde mit Kpn I geschnitten, denn das 4800 bp große Teilstück wurde für die Wiederherstellung eines ganzen eNOS-Plasmides benötigt.



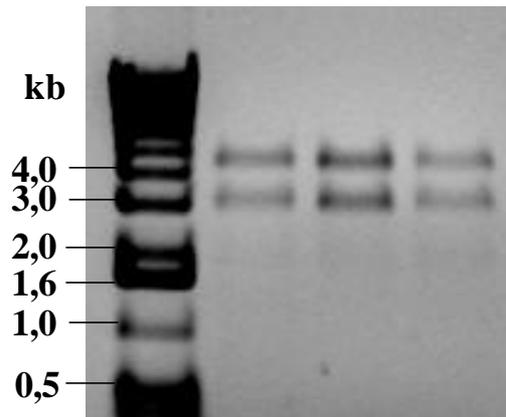
**Abb. 33:** Agarose-Gel mit den Fragmenten der bovinen eNOS im Bluescript Vektor nach Verdau mit Kpn I (2 x aufgetragen, da eine große Menge benötigt wurde). Die zu isolierenden DNA-Stücke hatten eine Größe von 4800 bp.

Nach dem Kpn I Verdau der bovinen eNOS erhielt man zwei DNA-Fragmente mit den Größen 4800 und 2300 bp (Abb. 33). Die 4800 bp-Bande wurde aus dem Gel isoliert und mit alkalischer Phosphatase behandelt um eine Religation des Fragmentes zu vermeiden. Das ebenfalls mit Kpn I geschnittenen Produkt der PCR 3, welches die Mutation enthält, wurde nun zusammen mit dem 4800 bp Fragment aus dem Kpn I Verdau des bovinen eNOS-Bluescript-Plasmides ligiert.



**Abb. 34:** Schematische Darstellung des C101A-pbl2SK+ Plasmides. Die eingezeichneten EcoRI Schnittstellen sind zur Überprüfung der richtigen Orientierung der eingefügten DNA nach der Ligation.

Nach der Transformation des Ligationsansatzes in Bakterienzellen und anschließender Mini-Plasmid Präparation wurden die Startkultur-Plasmide mit Eco R I verdaut. Bei richtiger Orientierung des eingebauten 2341 bp PCR 3 Produktes, mussten zwei DNA-Fragmente mit den Größen 4100 und 2900 bp entstehen.

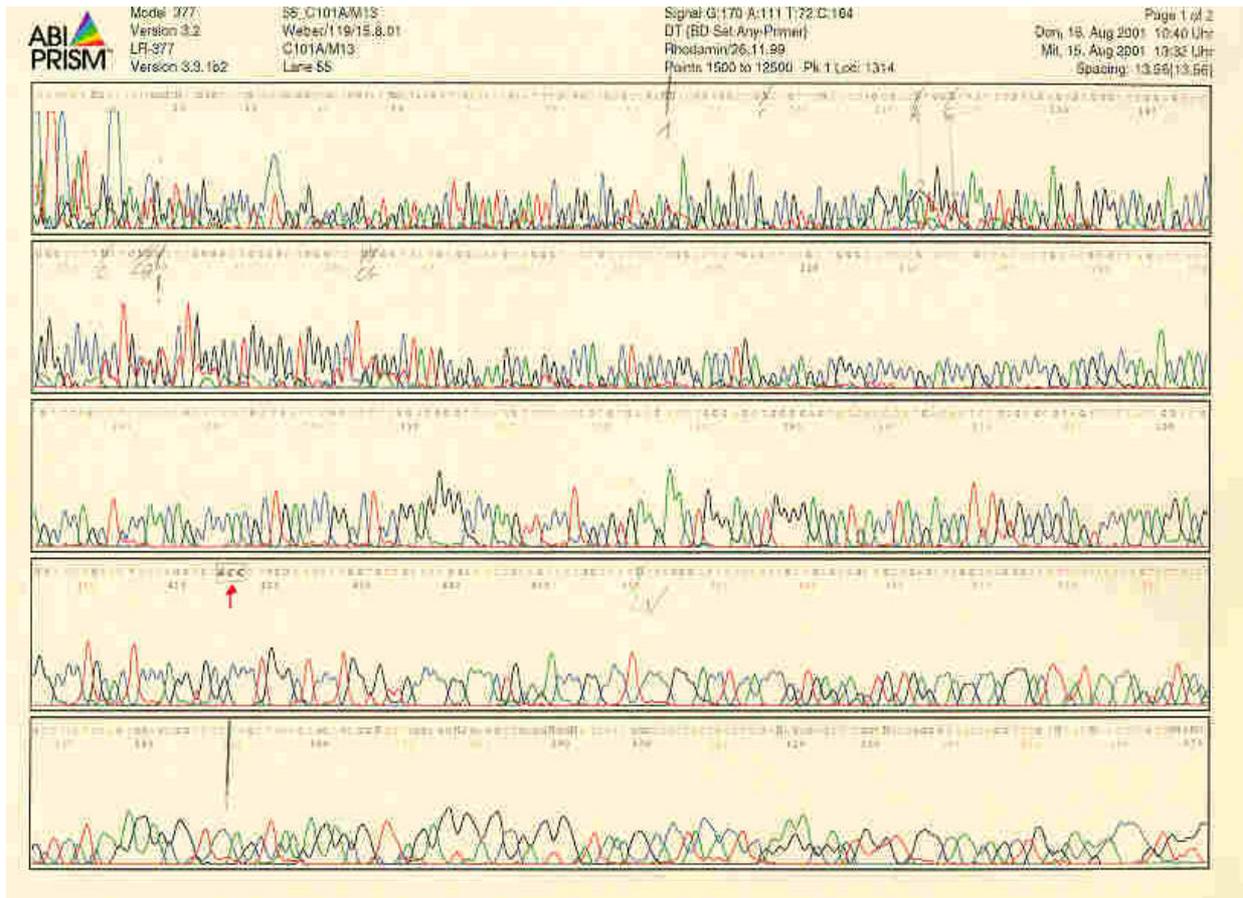


**Abb. 35:** Produkte des *Eco R I*-Verdau dreier Startkultur-Plasmide, aufgetrennt in einem Agarose Gel. Das PCR-3 Produkt wurde in allen Startkulturen in der richtigen Orientierung gefunden, da die beiden Fragmente mit den Größen 4100 und 2900 bp beim Verdau entstanden sind.

Der Verdau der Startkultur-Plasmide mit *Eco R I* zeigte eine richtige Orientierung des PCR 3 Produktes, da die Banden mit den Größen 2900 bp und 4100 bp im Gel zu erkennen waren (Abb. 35). Eines der Plasmide wurde weiter vermehrt, gereinigt und zur Sequenzierung gegeben.

### 5.4.2 Sequenzierung der mutierten eNOS

Die C101A-eNOS im Bluescript Vektor wurde sequenziert um die eingeführte Mutation zu bestätigen.



**Abb. 36:** Computerausdruck des Sequenziergerätes ABI Prism 377<sup>TM</sup> von der Sequenzierung des C101A-eNOS-Bluescript-Plasmides. Dargestellt ist die Sequenz der ersten 600 Basen. An der mit dem roten Pfeil markierten Stelle ist die eingeführte Mutation zu finden.

Der Vergleich der Sequenzen der Wildtyp eNOS (WT) und der Mutante (MT) ergab, dass sie sich nur in der Position 301/302 (ausgehend vom ATG) unterscheiden. Der Basenaustausch von TG im WT zu GC in der MT war somit erfolgreich (vergl. Methoden 2.7.2.8).

Um die Auswirkungen der Mutation auf die Funktionalität der eNOS zu überprüfen, wurde das Enzym in Zellen exprimiert.

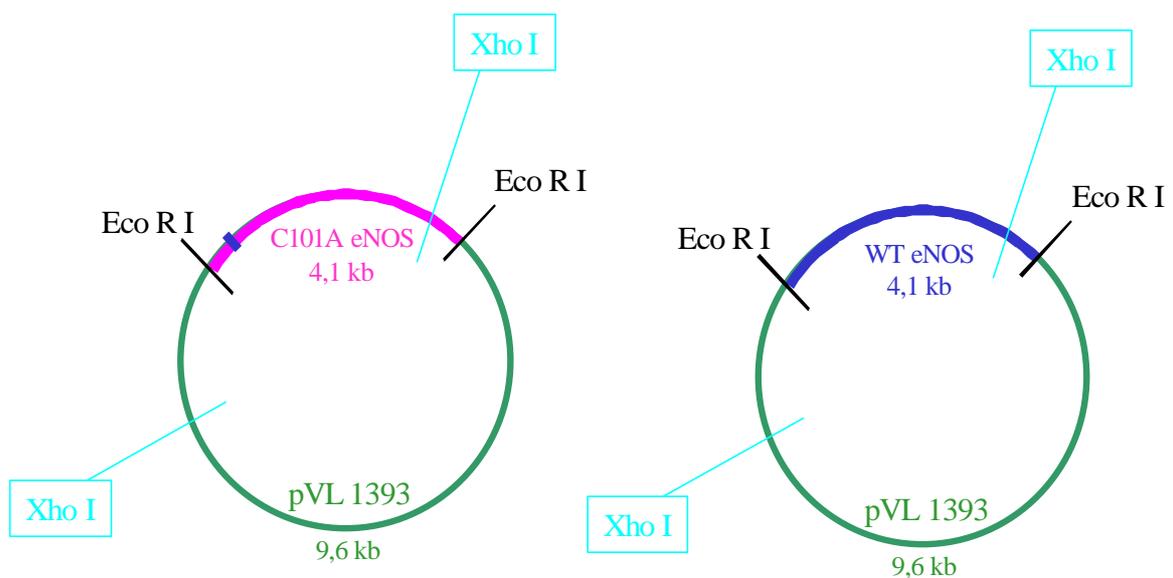
### 5.4.3 Expression der eNOS in Sf 9 Zellen

#### 5.4.3.1 Ligation der eNOS in den pVL 1393 Vektors

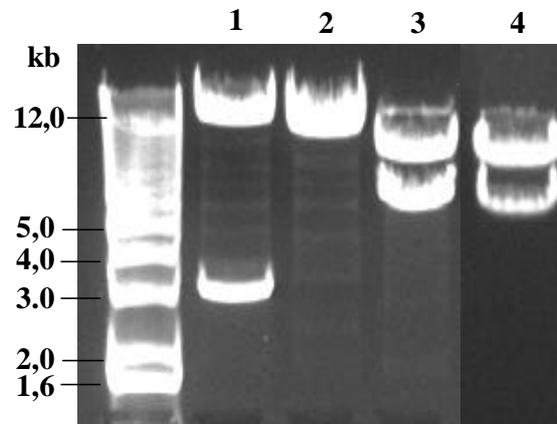
Der pVL 1393 Vektor ist ein spezifischer Vektor zur Expression von Genen in Sf 9 Zellen.

Die WT- und C101A-eNOS wurden mit dem Restriktionsenzym EcoR I aus dem Bluescript Vektor herausgeschnitten (Abb 37). Die 4100 bp- Bande wurde aus dem Gel isoliert und zusammen mit dem ebenfalls mit EcoR I und Alkalischer Phosphatase behandelten pVL 1393 Vektors ligiert.

A



B

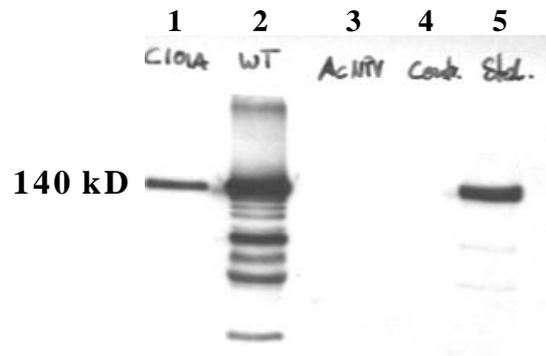


**Abb. 37:** *A:* Schematische Darstellung der WT- und C101A-eNOS im pVL 1393 Vektor, markiert sind die Schnittstellen des Restriktionsenzym *Xho I*, mit dem die Orientierung der eNOS nach Einfügen in den *EcoR I* geschnittenen pVL 1393 überprüft wurde. *B:* Agarose Gel mit den Fragmenten von 3 verschiedenen Ligations-Produkten. *Spur 1:* falsche Orientierung der MT-eNOS; *Spur 2:* die WT-eNOS wurde nicht in den Vektor ligiert; *Spur 3:* richtige Orientierung der C101A-eNOS im pVL 1393 mit den Fragmentgrößen 5600 bp und 8100 bp; *Spur 4:* richtige Orientierung der WT-eNOS im pVL 1393 mit den gleichen Fragmentgrößen wie die Mutante.

Das Produkt der Ligation wurde in Bakterienzellen transformiert, die Kolonien herangezogen und die DNA verschiedener Kolonien präpariert. Zur Überprüfung der richtigen Orientierung der WT- und C101A-eNOS im pVL 1393 Vektor wurde ein Verdau mit *Xho I* vorgenommen. Bei richtiger Orientierung entstanden zwei Fragmente mit den Größen 5600 und 8100 bp (Abb. 37). Die WT- und MT-eNOS im pVL 1393 Vektor wurde nach der Aufreinigung in Sf 9 Zellen transfiziert.

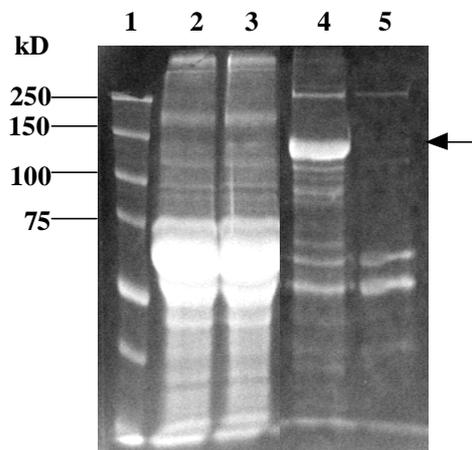
#### 5.4.3.2 Expression von WT- und MT-eNOS in Sf 9 Zellen

Nach Kotransfektion mit dem Baculovirus wurden die Sf 9 Zellen anhand eines Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper auf die eNOS-Expression hin untersucht. Sf 9 Zellen besitzen selbst keine eNOS. Die Kontrollzellen, die nur mit dem pVL-Vektor infiziert wurden, durften demnach kein Signal beim Western Blot zeigen.



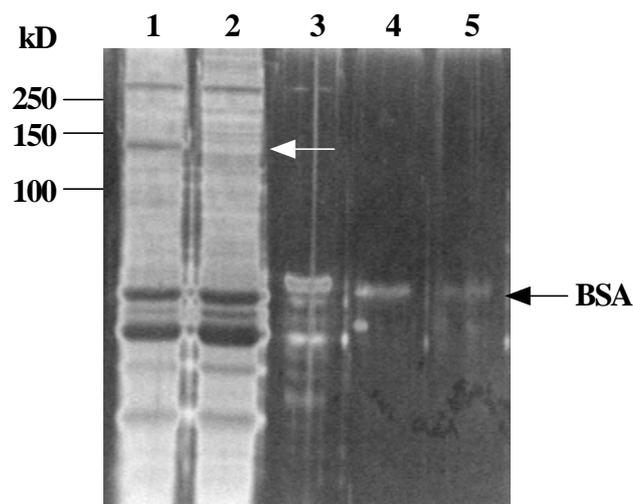
**Abb. 38:** Repräsentativer Western Blot für die Expression der WT- und MT-eNOS (140 kD) in Sf 9 Zellen. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die eNOS verwendet, der auch an die Mutante bindet. Aufgetragen wurden in jede Spur 20  $\mu$ g Gesamtprotein. Die Expression der C101A-eNOS (**Spur 1**) war geringer, als die eNOS Produktion des WT (**Spur 2**). In der **3. Spur** waren die nur mit dem Virus infizierten Zellen als Kontrolle dargestellt und in der **4. Spur** wurden 20  $\mu$ g Protein von nicht-transfizierten Sf 9 Zellen aufgetragen.

Der monoklonale Antikörper gegen die eNOS bindet am C-terminalen Ende der eNOS. Daher wurde seine Spezifität durch die Mutation, die ja schon in Position 101 liegt, nicht beeinflusst. Die WT- und MT-eNOS Enzyme wurden beide in den Sf 9 Zellen exprimiert, jedoch nicht gleich stark (Abb. 38). Die Expression der MT-eNOS war deutlich geringer, als die des Wildtypen. Deshalb sollte das WT- und MT-Enzym aus den Zellen isoliert und aufgereinigt werden.



**Abb. 39:** Coomassie Färbung des Polyacrylamid-Geles nach der eNOS-Isolierung aus Sf 9 Zellen, aufgetragen wurden jeweils 20  $\mu$ l Probe. **Spur 1:** Größenstandard; **Spur 2:** Eluat aus der Säule nach Bindung der WT-eNOS, es enthält alle anderen Proteine, die nicht an die ADP-Sepharose binden; **Spur 3:** gleiches Eluat wie bei 2, allerdings von der C101A-eNOS; **Spur 4:** NADPH-Eluat von der ADP-Sepharose nach dem Waschen, die isolierte WT-eNOS ist deutlich mit 135 kD zu erkennen; **Spur 5:** NADPH-Eluat der MT-Aufreinigung, nur sehr schwache Bande bei 140 kD (schwarzer Pfeil).

Obwohl eine sehr große Menge Sf 9 Zellen infiziert und zur Enzymisolierung herangezüchtet wurde, konnte nicht genügend C101A-eNOS gewonnen werden. Deshalb wurden erneut Sf 9 Zellen infiziert und sowohl WT- wie auch C101A-eNOS exprimiert. Nach erneuter Aufreinigung der Enzyme mit 2'5'-ADP-Sepharose erfolgte diesmal die Färbung des Polyacrylamid-Geles mit Silbernitrat, da eine Silber-Färbung geringere Mengen Protein detektieren kann als die Coomassie Färbung.



**Abb. 40:** Mit Silbernitrat entwickeltes Polyacrylamid-Gel; **Spur 1:** 20  $\mu$ l NADPH-Eluat der WT-eNOS Aufreinigung, Enzym zeigt eine deutliche Bande bei 140 kD; **Spur 2:** 20  $\mu$ l NADPH-Eluat der MT-eNOS Aufreinigung, nur sehr schwache eNOS-Bande bei 140 kD (markiert mit dem weissen Pfeil); **Spuren 3-5:** BSA-Lösungen zum Vergleich der Konzentration: 50ng (3), 20 ng (4) und 10 ng (5).

Nach dem Vergleich der Bandengröße der Eluate mit den aufgetragenen BSA-Konzentrationen zeigte sich, dass in dem NADPH-Eluat der MT-eNOS nur 10-20 ng Protein pro 20  $\mu$ l waren (Abb. 40). Diese Menge war für nachfolgende Untersuchungen nicht ausreichend. Deshalb wurden die WT- und MT-eNOS in einem anderen System exprimiert.

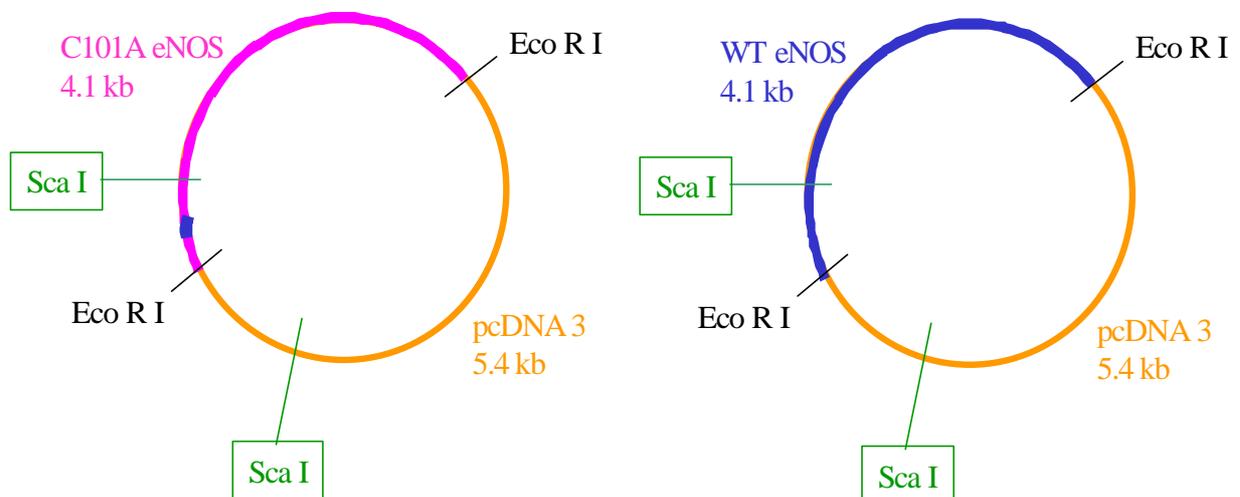
## 5.4.4 Expression der eNOS in 293 HEK-Zellen

### 5.4.4.1 Ligation der eNOS in den pcDNA 3 Vektor

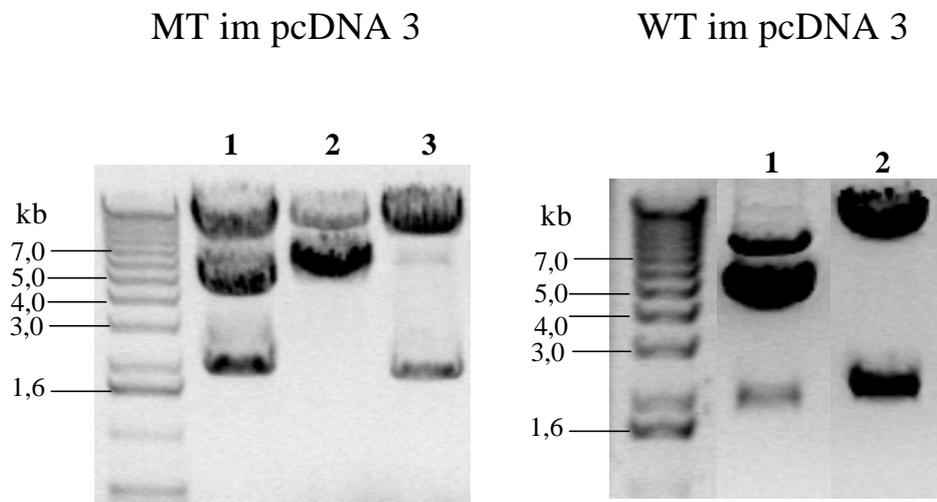
Da die Expression der MT-eNOS in den Sf 9 Zellen nicht stark genug war, wurden die cDNA der WT- und C101A-eNOS in den pcDNA 3 Vektor ligiert. Dieser Vektor ist zur Expression von Proteinen in 293 HEK Zellen geeignet. Es sollte eine stabile Transfektion vorgenommen werden, um eine maximale Expression der Proteine zu erreichen. Die humanen embryonalen Nierenzellen exprimieren selbst kein eNOS-Protein (siehe Abb. 42).

Der pcDNA 3 Vektor wurde mit EcoR I geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation zu verhindern. Wie schon im Abschnitt 3.4.3.1 beschrieben, wurden die 4100 bp großen DNA Fragmente der WT- und MT-eNOS aus dem Gel isoliert und in den behandelten pcDNA 3 Vektor ligiert.

A



## B

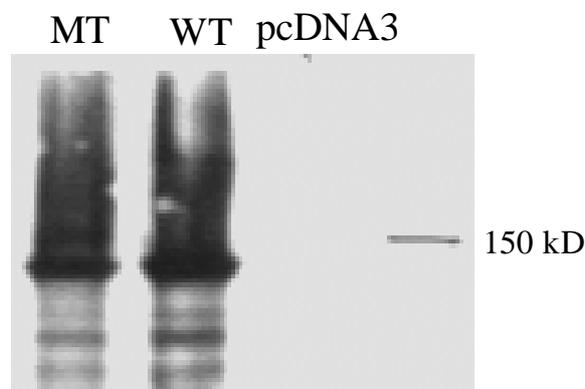


**Abb. 41:** **A:** Schematische Darstellung der C101A- und WT-eNOS im pcDNA 3 Vektor. In grün sind die Sca I Schnittstellen markiert, anhand derer die Orientierung der eNOS nach der Ligation überprüft werden konnte. **B:** Agarose Gel mit den Produkten des Sca I Verdaus der Startkulturen nach der Ligation. Bei der **MT** im pcDNA 3 ist nur die in **Spur 3** aufgetragene Probe richtig orientiert. Die Fragmente zeigen die Größe 1770 und 7720 bp. In der **1. Spur** scheint die MT-eNOS zweimal in den Vektor eingebaut worden zu sein, in der **2. Spur** war die eNOS falsch orientiert und es wurden die Fragmente 4501 und 4999 bp gebildet. Die Ligation der **WT**-eNOS in den pcDNA 3 Vektor war bei der in **Spur 2** aufgetragenen Probe erfolgreich und der Sca I Verdaus zeigte die richtigen DNA Fragmentgrößen (identisch mit MT), bei der Probe in **Spur 1** scheint auch die WT-eNOS zweimal in den Vektor ligiert worden zu sein.

Nach der Ligation wurden anhand eines Sca I Verdaus die Plasmide der Startkulturen auf die Orientierung der WT- und MT-eNOS im Vektor untersucht (Abb. 41). Bei richtiger Orientierung mussten DNA Fragmente mit 1770 bp und 7720 bp entstehen, falscher Einbau führte zu zwei fast gleich großen Stücken mit 4501 bp und 4999 bp. Die Plasmide mit der WT- und MT-eNOS in richtiger Orientierung wurden weiter vermehrt und gereinigt. Sie wurden mit SuperFect<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) in die 293 HEK Zellen transfiziert.

#### 5.4.4.2 Expression von WT- und MT-eNOS in 293 HEK Zellen

Nach der Transfektion der HEK-Zellen mit den beiden eNOS-Plasmiden und dem pcDNA 3 Vektor als Kontrolle wurde eine stabile Zelllinie etabliert. Nach Zugabe von 800 µg/ml G418 Sulfat zum Medium starben die nicht-transfizierten Zellen ab, die überlebenden Zellen wurden weiter kultiviert. Die Expression der eNOS wurde in einem Western Blot mit dem eNOS-Antikörper überprüft.



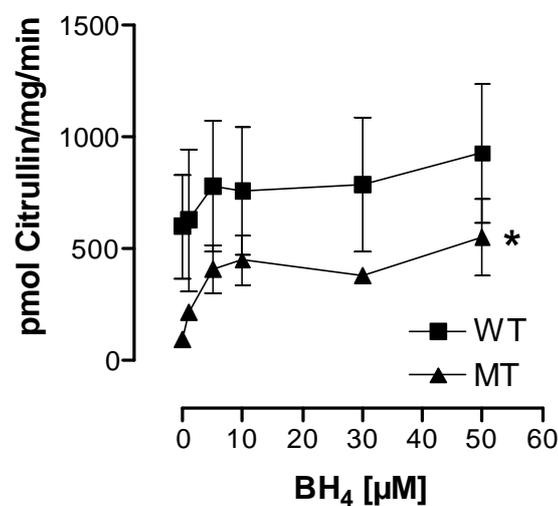
**Abb. 42:** Western Blot aus WT und MT stabil transfizierten HEK Zellen. Eine gleiche Anzahl Zellen wurde nicht lysiert, sondern nur auf dem 6-Well mit Lämmli-Puffer versehen, 50 µl wurden direkt auf das Gel geladen. Die eNOS (dicke Bande bei 140 kD) ist bei den WT- und MT-Zellen gleich stark exprimiert. Die mit dem pcDNA 3 Vektor transfizierten Zellen zeigen keine eNOS-Expression.

Der Western Blot zeigte, dass die Expression der eNOS in den mit WT- und C101A-eNOS stabil transfizierten Zellen gleich war. Die zur Kontrolle nur mit dem pcDNA 3 Vektor transfizierten Zellen exprimierten wie erwartet kein eNOS Protein.

Da die Expression der WT- und C101A-eNOS in den HEK Zellen gleich stark war, konnten die folgenden Versuche direkt mit diesen Zellen vorgenommen werden.

### 5.4.5 Untersuchungen der eNOS-Aktivität in WT- und MT-HEK Zellen in Abhängigkeit von BH<sub>4</sub>

Um den Erfolg der Mutation der eNOS auf funktioneller Ebene zu überprüfen, wurde zuerst die Aktivität der WT- und MT-eNOS nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an BH<sub>4</sub> im Zellhomogenat untersucht (Abb. 43).



**Abb. 43:** Spezifische Aktivität der eNOS in WT- und MT-Zellhomogenaten. Es wurde die Abhängigkeit der Aktivität von BH<sub>4</sub> anhand einer Dosiswirkungskurve untersucht. Die Aktivität der MT-eNOS ist signifikant niedriger als die in den WT-Zellen gemessene Aktivität (\*,  $P=0,006$ ,  $n=3$ ).

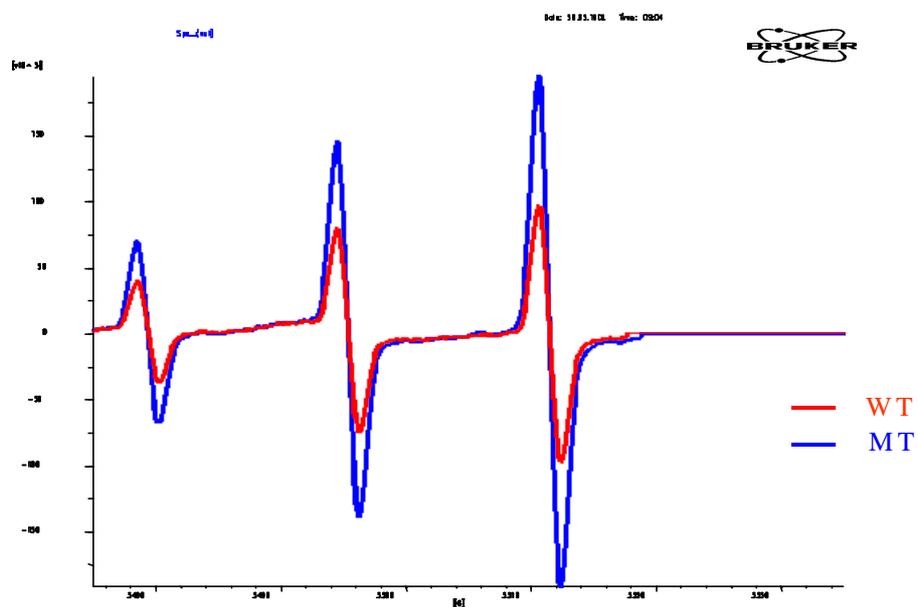
Dem Zellhomogenat wurden 0, 1, 5, 10, 30 und 50 μM BH<sub>4</sub> zugesetzt. Die basale eNOS-Aktivität ist in den WT-Zellen mit  $601 \pm 233$  pmol Citrullin/mg/min deutlich höher, als die basale Aktivität der MT-Zellen mit  $98 \pm 5$  pmol Citrullin/mg/min. Beide Aktivitäten steigen durch BH<sub>4</sub>-Zugabe an, doch insgesamt bleibt die Aktivität der MT-Zellen signifikant niedriger, als die der WT-Zellen ( $P=0.006$ ,  $n=3$ ). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass durch die C101A-Mutation die Affinität der eNOS gegenüber BH<sub>4</sub>, und als Folge die katalytische Aktivität tatsächlich verändert hat. Es war nicht möglich, durch steigende BH<sub>4</sub>-Zugabe dieselbe maximale Aktivität in den MT-Zellen zu erreichen, wie sie in den WT-Zellen mit 50 μM BH<sub>4</sub> gemessen werden konnte.

## 5.4.6 Messung von Superoxidradikalen in WT- und MT-HEK Zellen

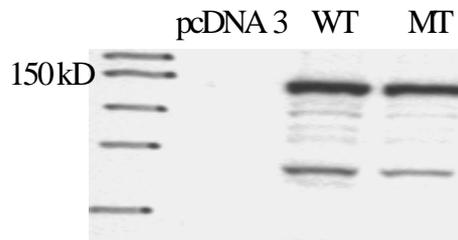
### 5.4.6.1 Basale $O_2^{\cdot -}$ -Bildung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die mutierte eNOS eine geringere spezifische Aktivität hat und diese auch durch  $BH_4$ -Zugabe nicht an die spezifische Aktivität des Wildtypen angeglichen werden kann, wurde im Folgenden die Superoxidradikal-Produktion in den transfizierten Zellen mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Messung untersucht.

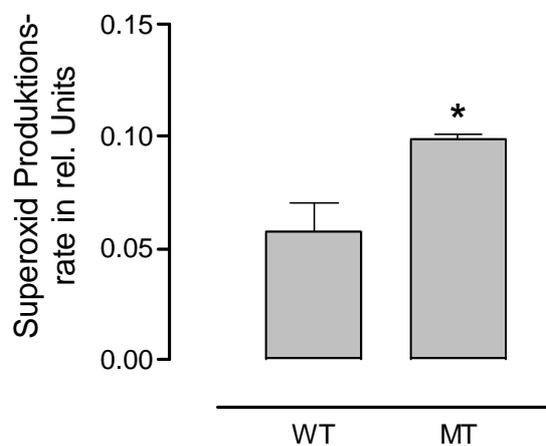
A



B



C

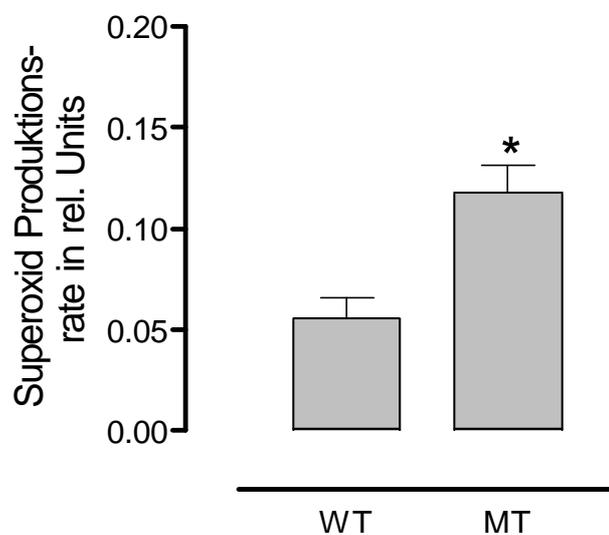


**Abb. 44:** **A:** Mit ESR aufgenommener Triplet-Peak der Superoxidradikale in WT- und MT-Zellen, gemessen mit CMH als Spin Trap; **B:** eNOS Western Blot aus denselben Zellen der verdeutlicht, dass beide Enzyme gleich stark exprimiert wurden; **C:** Auswertung der Superoxid-Produktionsrate in WT- und MT-Zellen ( $n=4$ ), die Superoxid-Produktionsrate in den MT-Zellen war signifikant höher als in den WT-Zellen (\*,  $P=0,0199$ ).

Das mit ESR aufgenommene Signal der mit CMH-Spin Trap gemessenen Superoxidradikale in den MT-Zellen war deutlich größer, als das Signal der vermessenen WT-Zellen (Abb. 44). Da beide eNOS-Enzyme in derselben Anzahl Zellen gleich stark exprimiert wurden, konnte anhand der im Time Scan (siehe Methoden, 2.6.5.3) ermittelten Steigung die  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate (in rel. Units) ermittelt werden. Sie war in den MT-Zellen mit  $0,0986 \pm 0,0026$  signifikant höher als in den WT-Zellen ( $0,0573 \pm 0,0128$ ,  $P < 0,02$ ,  $n=4$ ).

#### 5.4.6.2 $O_2^{\bullet-}$ -Messung nach Stimulation der eNOS mit Ca-Ionophor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die basale  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate in den MT-Zellen signifikant erhöht war, wurde die Superoxidproduktion nach Zugabe von 10  $\mu$ M des eNOS Aktivators Ca-Ionophor untersucht. Die dadurch ausgelöste Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert die eNOS und sollte zu einer Steigerung des Unterschiedes bei der Superoxidradikalbildung führen.

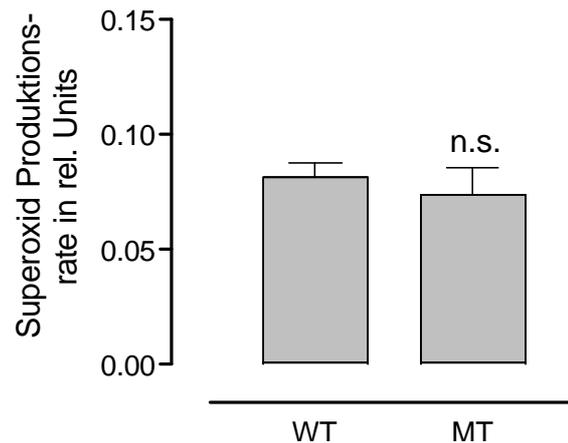


**Abb. 45:** Superoxid-Produktionsrate in WT- und MT-Zellen (n=4) stimuliert mit Ca-Ionophor; die Superoxid-Produktionsrate in den MT-Zellen war auch nach Stimulation signifikant höher als in den WT-Zellen (\*, P=0,0094).

Eine Stimulation der WT- und MT-eNOS in den Zellen vergrößerte den signifikanten Unterschied in der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion (P=0,0094, n=4) (Abb. 45). Die MT-Zellen zeigten eine  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate von  $0,1183 \pm 0,0134$  rel. Units gegenüber  $0,0562 \pm 0,0097$  rel. Units in den WT-Zellen.

### 5.4.6.3 $O_2^{\bullet-}$ -Messung nach Hemmung der eNOS mit L-NAME

Mit der Zugabe von 1 mM L-NAME zu den WT- und MT-Zellen wurde der Effekt der Hemmung der eNOS auf die Radikalproduktion getestet.



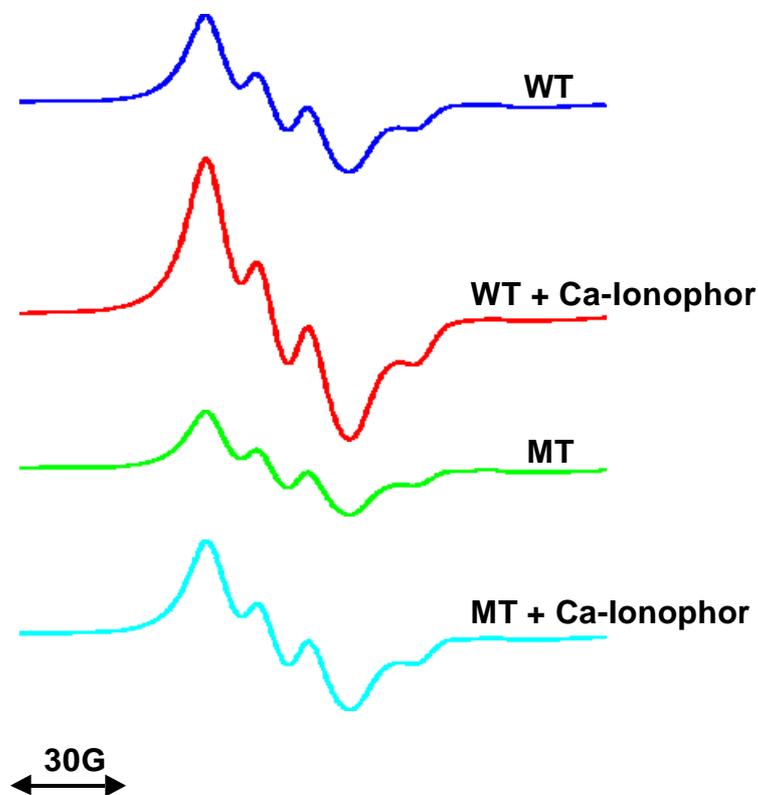
**Abb. 46:** Superoxid-Produktionsraten in WT- und MT-Zellenhomogenaten nach Hemmung der eNOS mit 1 mM L-NAME. Es konnte kein signifikanter Unterschied durch eine Hemmung der eNOS mit L-NAME festgestellt werden (n.s.,  $P > 0.05$ ).

Durch Inkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (1 mM) verschwand der signifikante Unterschied in der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate zwischen den WT- und den MT-Zellen (Abb. 46). Die WT-Zellen zeigten bei L-NAME-Zugabe eine leichte Erhöhung der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate, während es bei den MT-Zellen in Gegenwart von L-NAME zu einer Abnahme der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate kam (vergleiche Abb. 44 und 45). Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass in den WT-Zellen die Bildung der  $NO^{\bullet}$ -Moleküle, die sonst einen Teil des  $O_2^{\bullet-}$  abgefangen haben, gehemmt wurde. Bei den MT-Zellen dagegen bewirkte eine Hemmung des Enzyms auch eine Erniedrigung der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktionsrate. Dieses Ergebnis zeigt, dass die C101A-eNOS Superoxidradikale produziert.

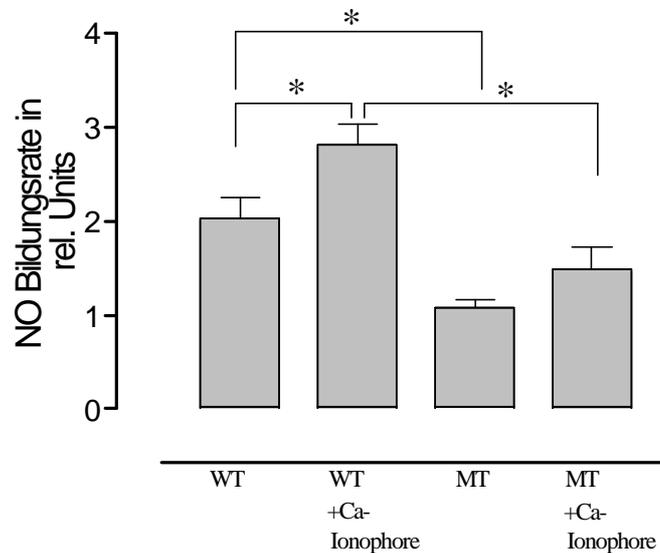
### 5.4.7 Messung der NO<sup>•</sup>-Produktion in WT- und MT-Zellen

Neben der Aktivitäts-Bestimmung der eNOS, bei der die Citrullin-Umsetzung bestimmt wurde, wurde dann mittels ESR-Messung die Bildungsrate von NO<sup>•</sup>-Molekülen in WT- und MT-Zellen untersucht. Der Vergleich der 3 Peaks der NO<sup>•</sup>-Signale (Abb. 47) ließ bereits erkennen, dass die MT-Zellen weniger NO<sup>•</sup> freisetzen als der WT. Bei Stimulation mit Ca-Ionophor ist dieser Unterschied noch deutlicher sichtbar.

A



B



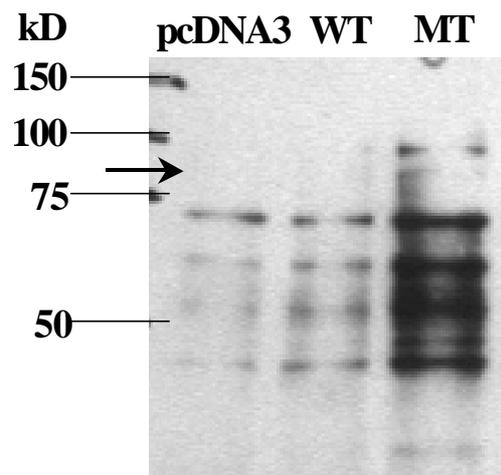
**Abb. 47:** **A:** Typische  $\text{NO}^{\bullet}$  Triplett-Peaks, WT normal, stimuliert mit Ca-Ionophore, MT normal und stimuliert mit Ca-Ionophore **B:**  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate in WT- und MT-Zellen ( $n=3$ ). Mit ESR vermessen wurde die basale und mit  $10 \mu\text{M}$  Ca-Ionophore stimulierte  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate der Zellen nach Inkubation mit  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ . Signifikant verschieden waren die basalen Bildungsraten von WT zu MT (\*,  $P<0,05$ ), die Stimulation des WT mit Ca-Ionophor hatte eine signifikante Erhöhung der  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate zur Folge (\*,  $P<0,05$ ). Die stimulierten WT-Zellen unterschieden sich deutlich in ihrer  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate von den stimulierten MT-Zellen (\*,  $P<0,01$ ).

Die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate (in rel. Units) in den WT-Zellen war mit  $2,03 \pm 0,23$  doppelt so hoch wie in den MT-Zellen ( $1,08 \pm 0,09$ ,  $P<0,05$ ,  $n=3$ ) (Abb. 47). Durch eine Stimulation der eNOS mit  $10 \mu\text{M}$  Ca-Ionophor konnte die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate in den WT-Zellen auf  $2,82 \pm 0,22$  rel. Units signifikant gesteigert werden ( $P<0,05$ ). Die MT-Zellen ließen sich durch eine solche Stimulation kaum zu einer vermehrten  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildung anregen. Mit  $1,49 \pm 0,04$  rel. Units war die  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate in den stimulierten Zellen nicht signifikant erhöht gegenüber den nicht-stimulierten Zellen. Allerdings war die Produktionsrate der stimulierten MT-Zellen signifikant verschieden von den stimulierten WT-Zellen ( $P<0,01$ ). Die C101A-eNOS zeigte also eine geringere  $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildungsrate als der WT, sowohl im basal- also auch im stimulierten Zustand.

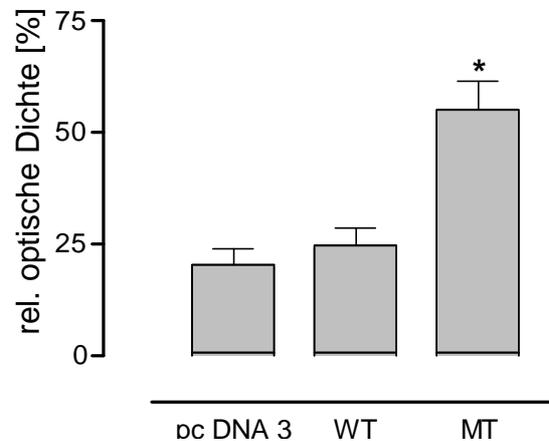
### 5.4.8 Überprüfung der Modifikationen von Proteinen in transfizierten HEK Zellen

Mit dem Oxyblot™ wurde in Homogenaten von pcDNA 3-, WT- und MT-Zellen das Ausmaß der Modifikation der Proteine durch freie Radikale überprüft. Detektiert wurden dabei alle Proteine, deren Aminosäure-Reste durch Oxidation zu Carbonylgruppen verändert worden waren (siehe Methoden, 2.6.4) und ein Hydrazon gebildet haben. Der für die Hydrazone spezifische Antikörper zeigte im Oxyblot also sämtliche veränderten Proteine in den Zellhomogenaten an. Zur quantitativen Auswertung wurde eine repräsentative Bande kurz unter 75 kD ausgewählt (Abb. 48, schwarzer Pfeil) und diese für jede Zelllinie densitometrisch ausgewertet.

A



## B

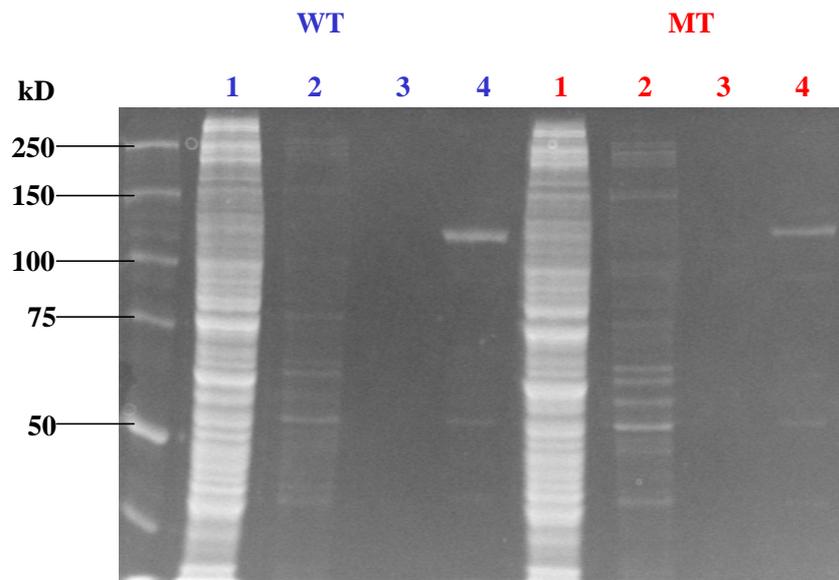


**Abb. 48:** **A:** Repräsentativer Oxyblot<sup>TM</sup> von pcDNA 3-, WT-, MT-transfizierten Zellen, aufgetragen wurden je 20 µg Gesamtprotein. Ausgewertet wurde die Bande kurz unter 75 kD (schwarzer Pfeil), die bei den MT-Zellen ein deutlich stärkeres Signal gab. **B:** Densitometrische Auswertung von insgesamt 6 Oxyblots. Die Modifikation der MT-Proteine war im Vergleich zu den nur mit pcDNA Vektor transfizierten Zellen, oder auch den WT-Zellen stark erhöht (\*,  $P=0,002$ ).

Das Signal der DNP-Hydrazone war bei den WT-Zellen im Vergleich zu nur mit dem pcDNA 3 Vektor transfizierten Zellen fast identisch. Die Transfektion mit der MT-eNOS führte erwartungsgemäß zu einem erhöhtem oxidativen Stress, was sich an dem weit stärkeren Signal im Oxyblot ablesen lässt (Abb. 38). Insgesamt konnten mehr als doppelt so viele DNP-Hydrazone in den MT-Zellen gefunden werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die durch die Mutante gebildeten Superoxidradikale zur vermehrten oxidativen Proteinmodifikation geführt haben.

### 5.4.9 Aufreinigung der WT- und C101A-eNOS aus den HEK Zellen

Um die bisherigen Ergebnisse auch am isolierten eNOS-Enzym zu überprüfen, wurde die WT- und C101A-eNOS aus den HEK Zellen isoliert.

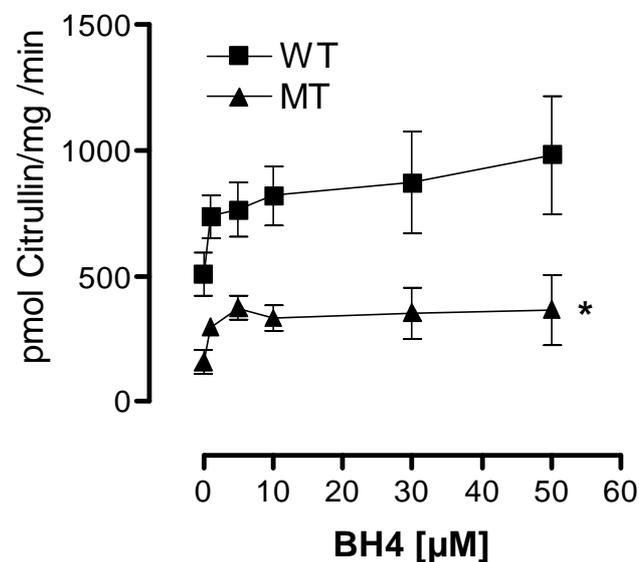


**Abb. 49:** Coomassie-Färbung der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung, WT, links; MT, rechts. **Spur 1:** Eluat der nicht an die ADP-Sepharose gebunden Proteine, **Spur 2:** Probe aus dem ersten Waschschrift, sie enthält immer noch Proteinreste, **Spur 3:** Probe aus dem dritten Waschschrift, **Spur 4:** NADPH-Eluat mit der WT- und MT-eNOS bei 135 kD.

Bei der Isolation der WT- und MT-eNOS aus den HEK Zellen konnten Proteinmengen von 7,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  des Wildtypen und 6,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gewonnen werden. Im mit Coomassie gefärbten Polyacrylamid Gel sind die eNOS-Banden bei 135 kD sowohl beim WT (Abb.49, Spur 4, blau) und bei MT (Spur 4, rot) gut zu erkennen. Die weiteren Untersuchungen wurden mit diesen aufgereinigten isolierten eNOS-Enzymen vorgenommen.

#### 5.4.10 Messung der spezifischen Aktivität gereinigter WT- und C101A-eNOS

Bei der Aktivitäts-Bestimmung der isolierten WT- und MT-eNOS wurde wie auch in den Zellhomogenaten (vgl. Abb. 43 und 50) ein signifikanter Unterschied gefunden. Die bei Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  BH<sub>4</sub> gemessene Aktivität (in pmol Citrullin/mg/min) der WT-eNOS war mit  $982 \pm 236$  signifikant höher als die Aktivität der C101A-eNOS mit  $365 \pm 138$  ( $P < 0,0001$ ,  $n=3$ ).



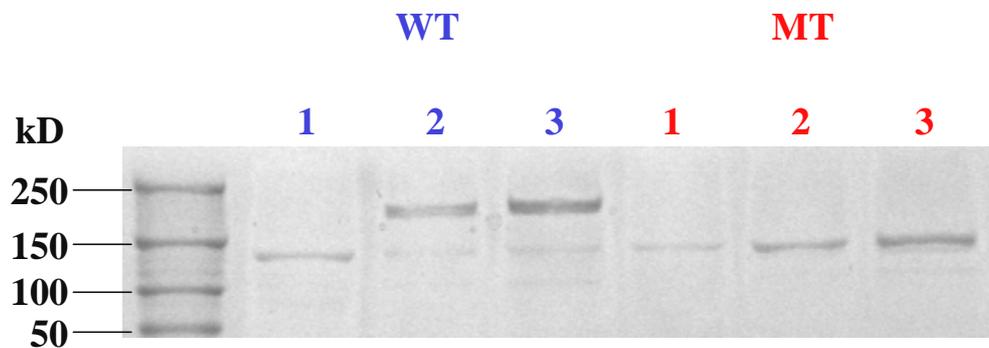
**Abb. 50:** Spezifische Aktivität der isolierten WT- und MT-eNOS. Die Aktivität der isolierten WT-eNOS war signifikant höher als die der isolierten MT-eNOS (\*,  $P < 0,0001$ ,  $n=3$ ).

Der signifikante Unterschied in der spezifischen Aktivität der WT- zur MT-eNOS konnte durch die Messung am isolierten Enzym bestätigt werden.

### 5.4.11 Überprüfung der Dimerisierung gereinigter WT- und C101A-eNOS

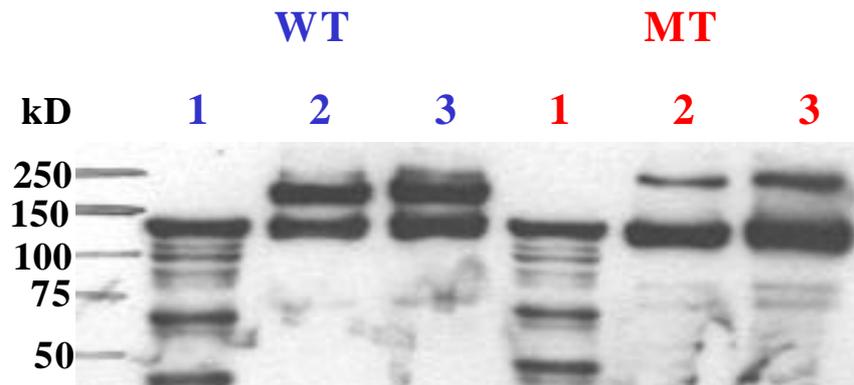
#### 5.4.11.1 Darstellung des eNOS-Dimers

Eine intakte Zinkbindung ist für die Dimerisierung der eNOS sehr wichtig. Die durch die Mutation der eNOS veränderte Zink-Bindung könnte eine Dimerisierung des Enzyms verhindern. Anhand von Cold-SDS-Gelen (siehe Methoden, 2.6.3.1) sollte in der MT im Vergleich zum WT die Dimerisierung der beiden eNOS-Enzyme untersucht werden. Wenn man die isolierten Enzyme nicht denaturiert, kann man unter speziellen Bedingungen das Dimer der eNOS mit ca. 230 kD im Gel darstellen (Abb. 51).



**Abb. 51:** Coomassie Färbung des Cold-SDS Geles mit aufgetragenen gereinigten WT- und MT-eNOS Enzymen. *Spur 1:* denaturiertes Protein, *Spur 2:* 25 µg WT/MT-eNOS, *Spur 3:* 50 µg WT/MT-eNOS. Bei der Coomassie Färbung kann man nur bei der nicht denaturierten WT-eNOS das Dimer erkennen.

Bei der Coomassie Färbung des Cold-SDS-Geles konnte man nur bei der WT-eNOS (Abb. 51, Spur 2 + 3, blau) deutlich das Dimer bei 230 kD erkennen. Die MT-eNOS ist nur als Monomer bei 140 kD sichtbar. Die denaturierten Proben (Spur 1, blau + rot) wurden als Kontrolle für das Monomer aufgetragen. Die Proteine wurden vom Gel auf eine Membran übertragen und ein Western Blot mit dem eNOS-Antikörper entwickelt.

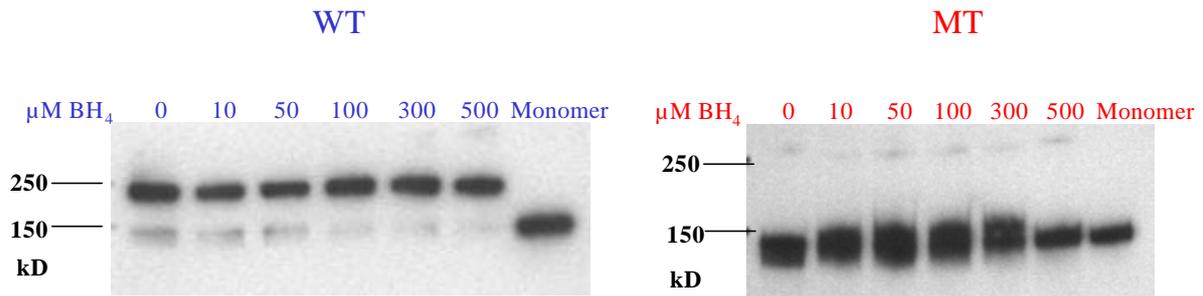


**Abb. 52:** Western Blot mit dem eNOS-Antikörper vom Cold-SDS-Gel (Abb. 3.4.21). eNOS-Monomere und Dimere (140 + 230 kD) sind bei beiden isolierten Enzymen zu erkennen (zur Aufteilung der Spuren siehe Abb. 51).

Im Western Blot aus dem Cold-SDS-Gel wie in Abb. 51 erkennt man, dass die MT-eNOS doch ein Dimer gebildet hatte (Abb. 52, Spur 2 + 3, rot), jedoch wesentlich weniger, als die WT-eNOS (Spur 2 + 3, blau). Darüber hinaus wird an diesem Western Blot auch deutlich, dass das Kochen der Proben zu einer Proteolyse der eNOS führte (siehe Abb. 52, WT und MT, jeweils Spur 1).

#### 5.4.11.2 Abhängigkeit der Dimerisierung von Tetrahydrobiopterin

Die Rolle von BH<sub>4</sub> bei der Dimerisierung ist letztlich nicht geklärt, doch wurde schon über die Notwendigkeit einer BH<sub>4</sub>-Zugabe bei der Dimersierung berichtet. Die isolierte WT- und MT-eNOS wurden also mit steigenden Konzentrationen von BH<sub>4</sub> versehen (0-500 μM) und ein Cold-SDS-Gel mit anschließender Entwicklung als Western Blot durchgeführt.



**Abb. 53** Western Blot von einem Cold-SDS Gel mit isolierter WT- und MT-eNOS in Abhängigkeit von BH<sub>4</sub>. Während bei der WT-eNOS die Dimerisierung mit steigender BH<sub>4</sub>-Konzentration zunahm, zeigte die MT-eNOS kaum Dimerisierung und auch keine Abhängigkeit von dem Kofaktor.

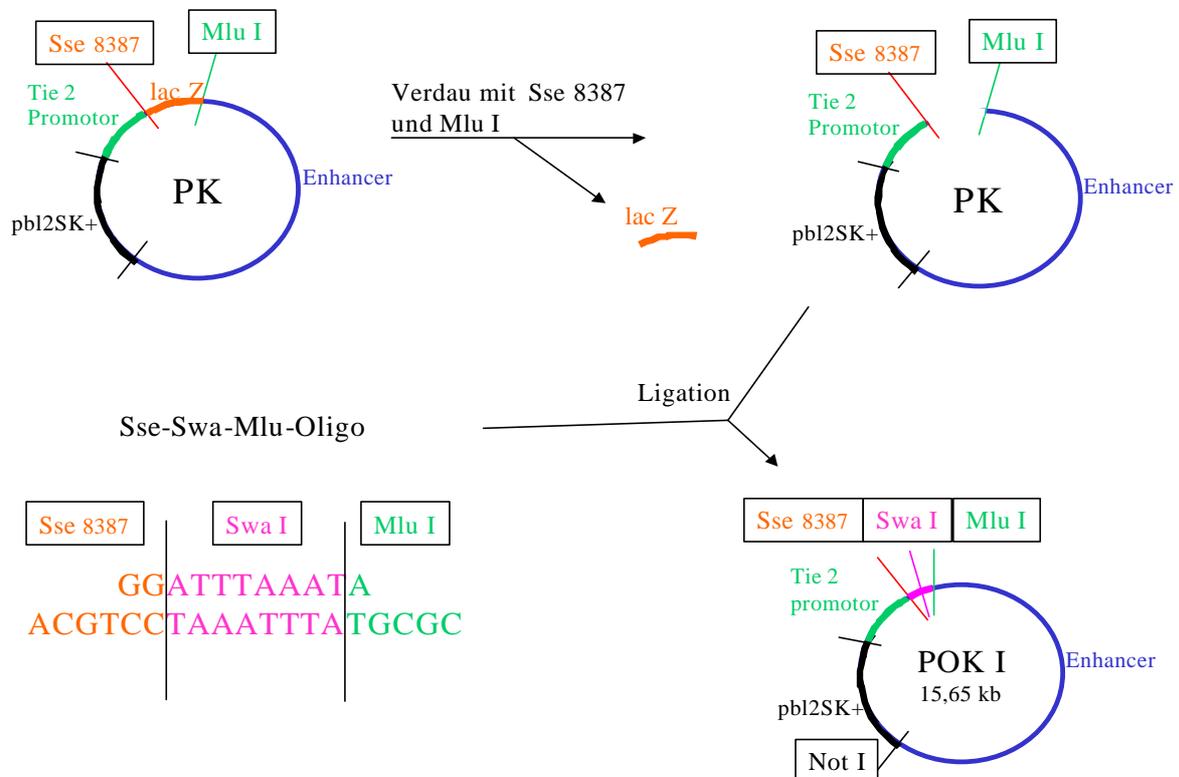
Schon ohne BH<sub>4</sub>-Zugabe lag die WT-eNOS hauptsächlich als Dimer vor (Abb. 53, 0, blau). Bei Erhöhung der BH<sub>4</sub>-Konzentration bis zu 500 μM nahm der Anteil des Monomers weiter ab, bis er kaum noch zu sehen war (500, blau). Als Vergleich wurde immer eine denaturierte Proteinprobe aufgetragen, die das Monomer darstellt. Nur sehr schwach ist bei der MT-eNOS überhaupt ein Dimer zu sehen (Bande über 250 kD), dies hat aber nicht die gewünschte Größe von 230 kD, sondern ist größer. Die Bildung eines Dimers war der MT-eNOS hier nicht möglich, auch nicht unter steigenden Konzentrationen an BH<sub>4</sub>. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die C101A-Mutation der eNOS die Dimerisierung gestört wurde und das Enzym in seiner Affinität gegenüber BH<sub>4</sub> verändert worden ist.

## 5.5 Herstellung des eNOS-Tie-2-Promotor-Plasmides

Zur Überprüfung der Auswirkung einer Überexpression der eNOS im Endothel wurde die bovine eNOS-cDNA in den Tie-2-Promotor kloniert. Das zugrunde liegende Tie-2-Promotor-Enhancer-Konstrukt (PK) mit einem insertierten lacZ-Gen war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten M. Schläger, Max Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim. Der Tie-2-Promoter bewirkt eine endothelspezifische Überexpression des jeweiligen Proteins in transgenen Tiermodellen (153).

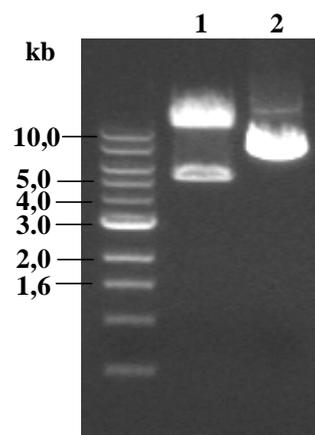
### 5.5.1 Veränderungen des Tie-2-Promotors

Um die bovine eNOS-cDNA in den Tie-2-Promotor zu klonieren, mussten in das Promotorkonstrukt zunächst Enzymschnittstellen eingefügt werden. Dazu wurden die entworfenen Oligos verwendet (siehe Methoden, 2.7.2.6) und nach folgendem Schema kloniert.



**Abb. 54:** Schematische Darstellung der Ligation des Sse 8387/Swa I/Mlu I-Oligos in das Tie-2-Promotor-Konstrukt.

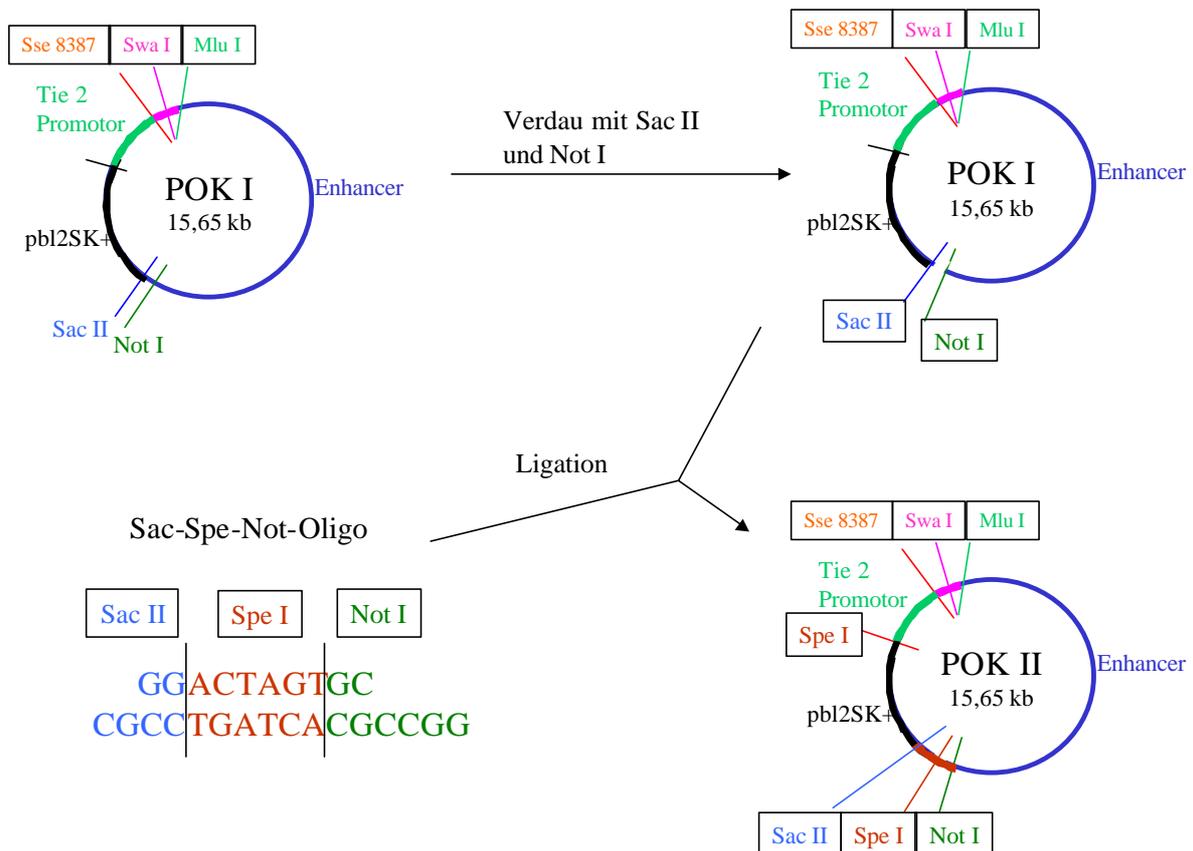
Mit Swa I sollte eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym eingefügt werden, dass glatte Enden schneidet. Das hatte den Vorteil, dass später die eNOS an einem Ende auch glatt geschnitten werden konnte und die cDNA Stücke aneinander passten. Mit den beiden Restriktionsenzymen Sse 8387 und Mlu I wurde das Tie-2-Promotor-Konstrukt (PK) aufgeschnitten. Dabei wurde die Sequenz für das lac Z Gen herausgetrennt. Das Produkt des Verdau wurde über eine Säule gereinigt und zur Ligation mit einem Oligo (Sse 8387/Swa I/Mlu I, siehe Abb. 54) eingesetzt. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in Bakterienzellen und Anzuchten der Startkulturen, wurden diese mit einem Swa I und Not I Verdau auf den Einbau des Oligos überprüft. War die Ligation erfolgreich, so musste sich das Plasmid mit Swa I, dessen Schnittstelle neu eingefügt worden war, und mit Not I in die Fragmente der Größe 5,05 Kilobasen (kb) und 10,6 kb schneiden lassen.



**Abb. 55:** Agarose Gel des Swa I, Not I-Verdau nach der Ligation des Sse 8387/Swa I/Mlu I-Oligos in das Tie-2-Promotor Konstrukt. In der **1. Spur** waren die beiden Fragmente von 5,05 kb und 10,6 kb zu erkennen, die ein erfolgreiches Einfügen des Sse 8387/Swa I/Mlu I-Oligos beweisen. In der **2. Spur** war das Oligo nicht eingebaut worden, da sich das Plasmid nicht mit Swa I schneiden ließ.

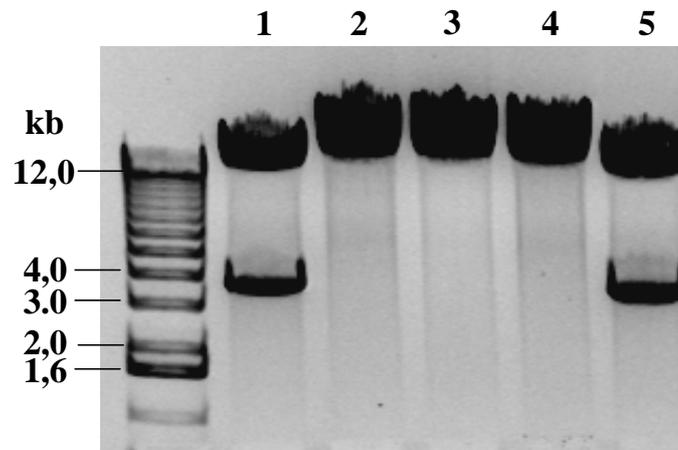
Die Zellen der Startkultur 1 (siehe Abb. 55) mussten das Promotor-Oligo-Konstrukt I (POK I) enthalten, denn sie ließen sich mit Swa I und Not I in zwei 5,05 und 10,6 große Stücke schneiden. Da Swa I sonst nicht in dem Tie-2-Promotor Konstrukt schneidet, entstand bei nicht erfolgtem Oligo-Einbau nur ein Fragment. Das POK I wurde weiter vermehrt und aufgereinigt.

Um später den Tie-2-Promotor mit der eNOS und dem Enhancer ausschneiden zu können, musste noch eine weitere Schnittstelle eingefügt werden. Um den Bluescript Vektor heraustrennen zu können, wurde an seinem Ende zum Enhancer hin eine zusätzliche Spe I Schnittstelle eingefügt.



**Abb. 56:** Schematische Darstellung der Ligation des Sac II/Spe I/ Not I-Oligos in den POK I.

POK I wurde mit Sac II und Not I geschnitten und gereinigt. Zusammen mit dem Sac II/Spe I/Not I Oligo wurde das geschnittene POK I ligiert. Anhand eines Spe I Verdau konnte der Oligo-Einbau überprüft werden, denn da POK I nur eine Spe I Schnittstelle hat, ließ es sich beim Verdau lediglich linearisieren (Abb. 57, Spur 2, 3, 4). Das Promotor-Oligo-Konstrukt II (POK II), zeigte durch die neu eingefügte Spe I Schnittstelle nach dem Verdau zwei DNA Fragmente mit 12 kb und 3 kb (Spur 1, 5).

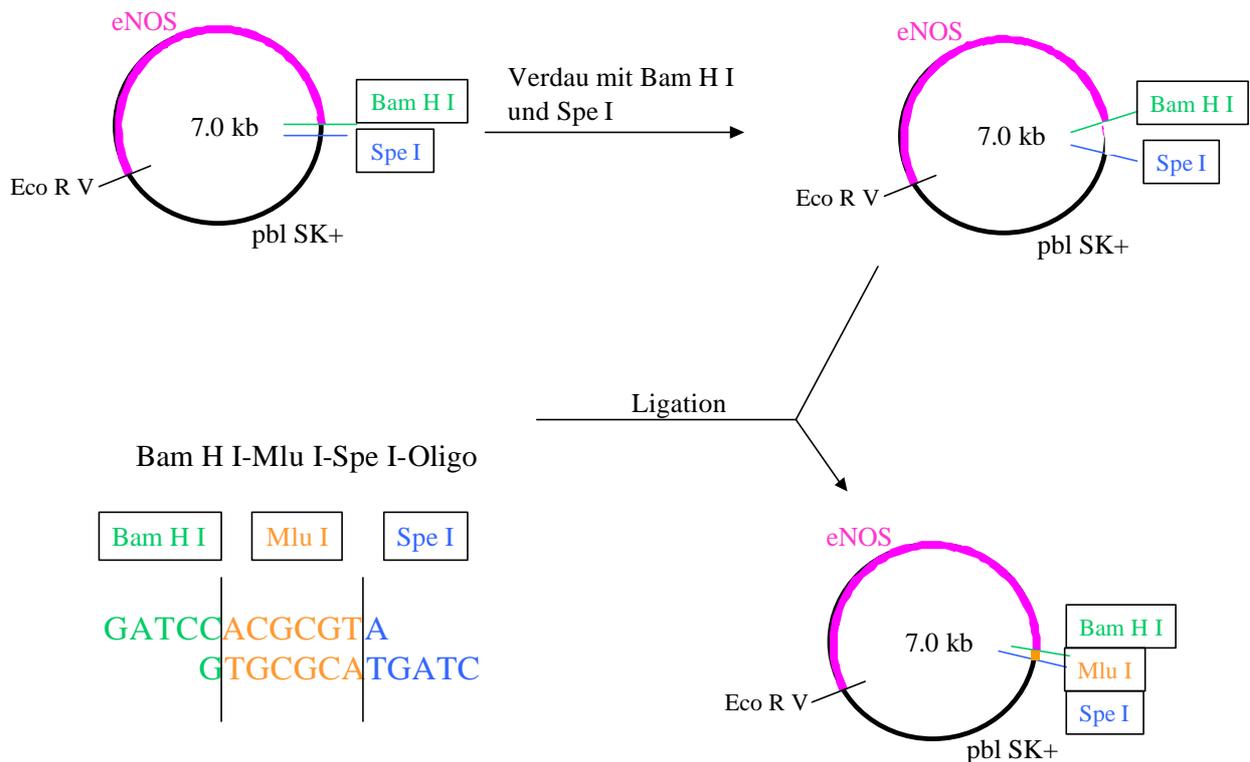


**Abb. 57:** Agarose Gel des *Spe I* Verdaus der Startkulturen nach der Ligation des POK I mit dem *Sac II/Spe I/Not I*-Oligo zu POK II, in die Plasmide in den **Spuren 1 und 5** wurde das Oligo eingebaut.

Durch die Einführung der *Swa I* und *Spe I* Schnittstellen war das Tie-2-Promotor Konstrukt fertig zur Klonierung mit der eNOS.

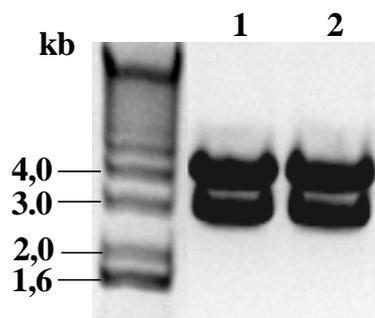
### 5.5.2 Veränderung des eNOS-Plasmides

Das bovine eNOS-Plasmid im Bluescript Vektor musste allerdings auch noch verändert werden, um es in das POK II ligieren zu können. Eine *Mlu I* Schnittstelle wurde am Ende der eNOS mit dem *Bam H I/Mlu I/Spe I*-Oligo eingefügt.



**Abb. 58:** Schematische Darstellung der Ligation des eNOS-Plasmide im Bluescript Vektor mit dem Bam H I/Mlu I/Spe I-Oligo.

Das eNOS-Plasmid wurde mit Bam H I und Spe I geschnitten und aufgereinigt. Zusammen mit dem Bam H I/Mlu I/Spe I-Oligo wurde es zu einem Plasmid ligiert und anschließend wurde der Einbau des Oligos mit dem Verdau durch Mlu I und Eco R V getestet. Wurde die neue Mlu I Schnittstelle eingebaut, so mussten sich die präparierten Plasmide aus den Startkulturen in zwei Fragmente der Größe 3 kb und 4 kb schneiden lassen.

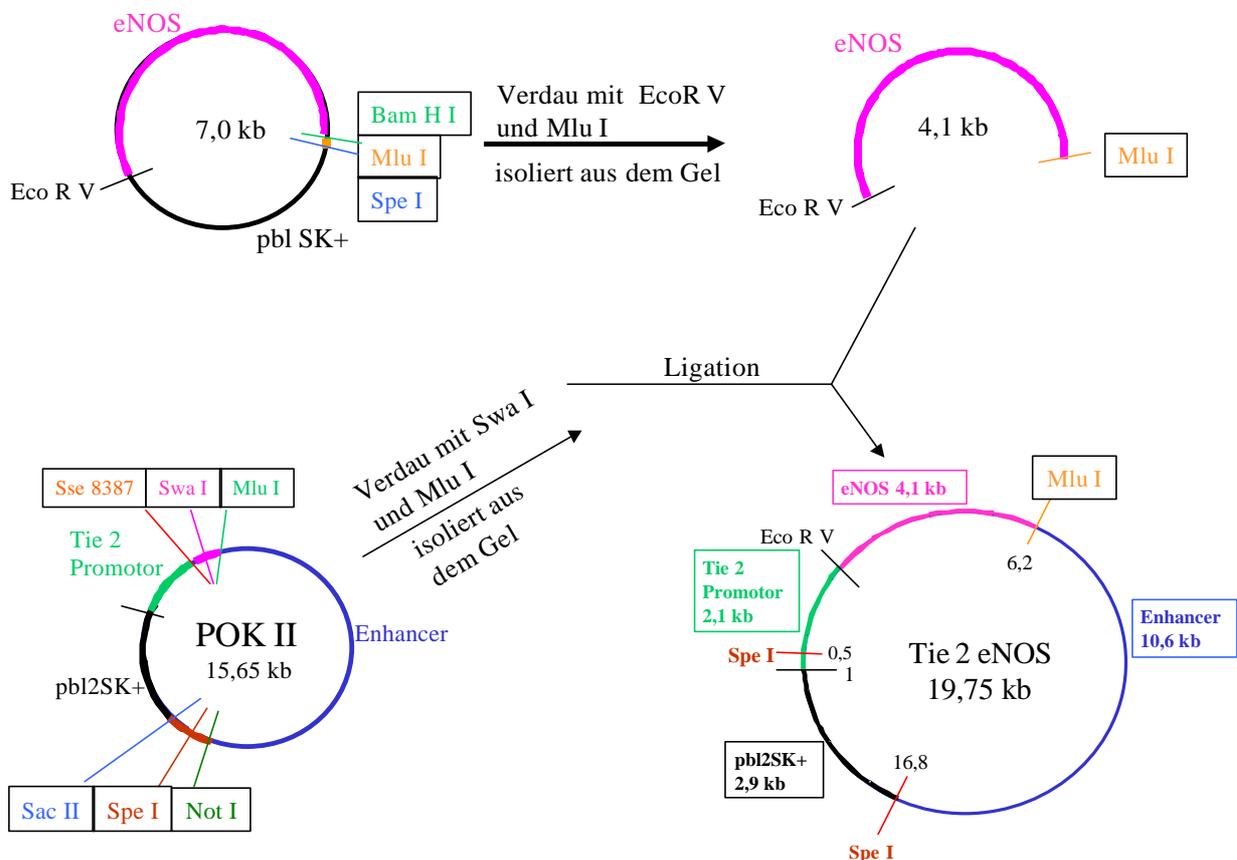


**Abb. 59:** Agarose Gel des Eco R V und Mlu I Verdau der Startkulturen nach Ligation. In beiden aufgetragenen Startkultur-Plasmiden (Spur 1 + 2) war das Oligo eingefügt worden, denn es ließ sich in ein 3 kb und 4 kb große Fragmente schneiden.

Die Startkultur-Plasmide wurden vermehrt und größere Mengen erneut mit Eco R V und Mlu I verdaut. Die 4 kb große Bande (Abb. 59) wurde dann aus dem Gel isoliert und in das POK II ligiert.

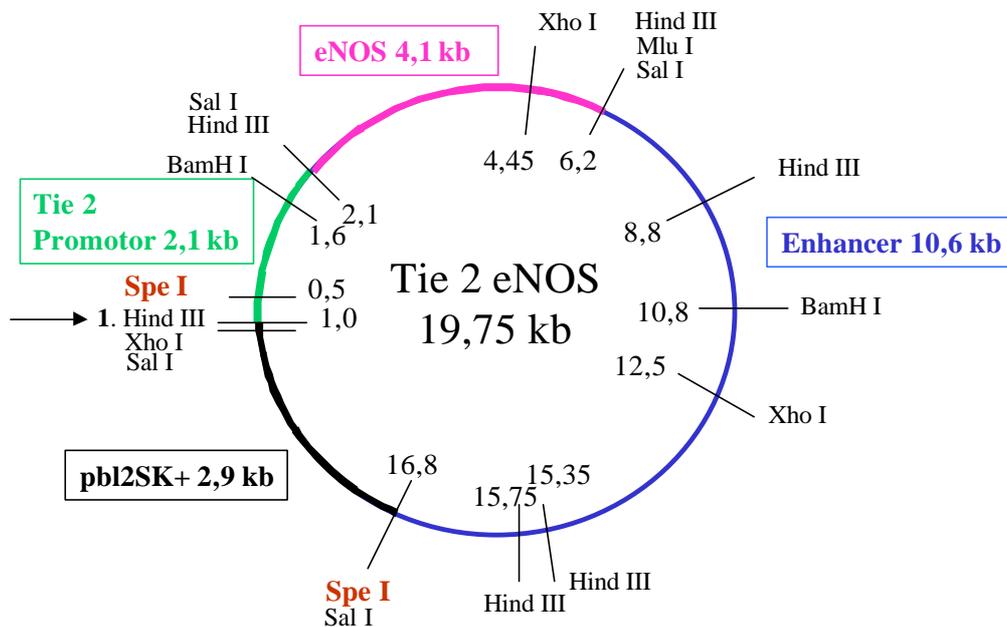
### 5.5.3 Ligation der eNOS-cDNA in POK II

Das POK II wurde mit Swa I und Mlu I geschnitten. Sowohl Eco R V als auch Swa I sind Enzyme, die glatte Enden schneiden, die in jedem Fall aneinander passen. An dem anderen Ende wurde die eNOS und POK II mit Mlu I geschnitten, so dass eine Ligation möglich war.



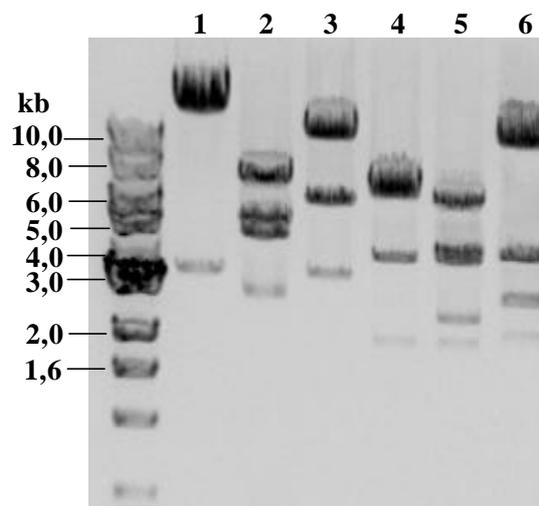
**Abb. 60:** Schematische Darstellung der Ligation der eNOS in das Tie-2-Promotor Konstrukt POK II.

Eine Religation war aufgrund Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme nicht möglich, ebenso wie es auch nicht zu einer falschen Orientierung der eNOS kommen konnte, da eine Schnittstelle glatt, die andere überhängend war.



**Abb. 61:** Schematische Darstellung des großen Plasmides Tie-2-eNOS mit den eingezeichneten Schnittstellen der verwendeten Enzyme bei der Restriktionsanalyse.

Es wurde mit dem Tie-2-eNOS-Plasmid eine große Restriktionsanalyse durchgeführt, um seine Richtigkeit zu bestätigen (siehe dazu Abb. 61).



**Abb. 62:** Zur Analyse verwendete Restriktionsenzyme: **Spur 1:** Spe I, **Spur 2:** Spe I + Xho I, **Spur 3:** Spe I + Mlu I, **Spur 4:** Hind III, **Spur 5:** Hind III + Mlu I, **Spur 6:** Sal I, alle Banden hatten die erwartete Größe.

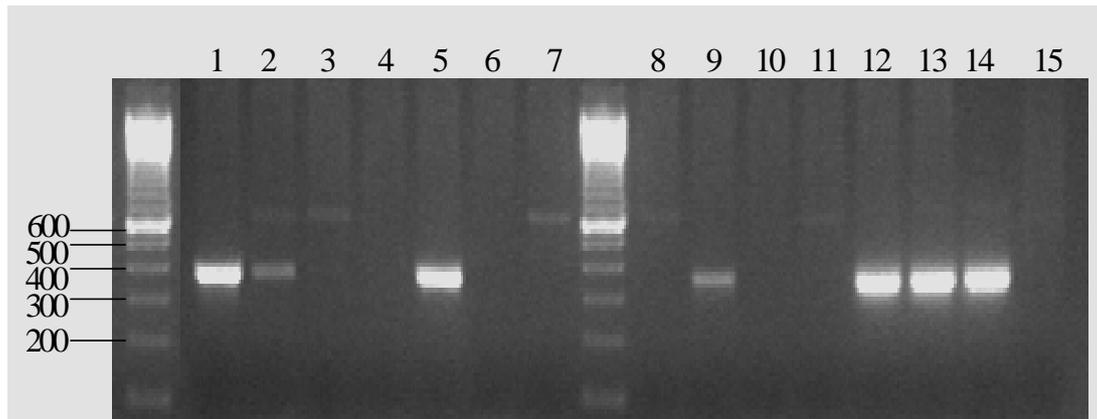
Es wurde mit den Enzymen Spe I, Xho I, Mlu I, Hind III und Sal I in folgender Kombination geschnitten:

<b>Restriktionsenzym:</b>	<b>zu erwartende Bandengröße:</b>
Spur 1: Spe I	3,4 + 16,5 kb
Spur 2: Spe I + Xho I	2,9 + 3,95 + 4,3 + 8,05 kb
Spur 3: Spe I + Mlu I	3,4 + 5,7 + 10,6 kb
Spur 4: Hind III	2,1 + 4,0 + 6,55 + 6,7 kb
Spur 5 : Hind III + Mlu I	2,1 + 2,6 + 4,0 + 4,1 + 6,55 kb
Spur 6 : Sal I	2,1 + 2,95 + 4,1 + 10,6

Da alle zu erwartenden Bandengrößen auch in dem Agarose Gel gesehen werden konnten (vergl. Abb. 61 und 62), wurde das Plasmid vervielfältigt und gereinigt. Es wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Rüter, Institut für Entwicklungsbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Mikroinjektion in die Mäuse abgegeben (siehe Methoden, 2.8). Dabei wurde das Tie-2-eNOS-Plasmid von Vektoranteilen befreit, indem es mit Spe I geschnitten wurde und die linearisierte DNA wurde injiziert. Die neue transgene Tierlinie wurde TgN(Tie2eNOS)GK genannt.

## 5.6 Genotypisierung der TgN(Tie2eNOS)GK

Nach einigen Monaten konnte in den ersten Founder Tieren der Genotyp bestimmt werden. Die aus den Schwanzspitzen der Mäuse isolierte DNA wurde mit 1  $\mu$ l, was ca. 1  $\mu$ g genomischer DNA entsprach, als Template in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.



**Abb. 63:** 2 %iges Agarose Gel mit jeweils 6  $\mu$ l PCR Produkt der Genotypisierung. Getestet wurden die Tiere 1-13 (*Spur 1-13*), *Spur 14*: Tie-2-eNOS-Plasmid als Positivkontrolle; *Spur 15*: genomische WT-DNA als Negativkontrolle.

Die Tiere 1, 2, 5, 9, 12 und 13 zeigten die richtige Bande von 351 bp in der Genotypisierung (Abb. 63). Die Vervielfältigung des Transgens in den Tieren 2 und 9 war geringer, als in den Tieren 1, 5, 12 und 13. Der Grund dafür könnte ein Fehler in der Aufarbeitung gewesen sein, oder weniger Transgen, was man aber nicht mit Sicherheit sagen konnte. Deshalb wurden alle sechs Tie-2-eNOS-positiven Tiere zur Rückkreuzung eingesetzt.

## **6 DISKUSSION**

---

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der radikal-induzierten Störungen des vaskulären NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges. Dabei wurden die zwei wesentlichen Komponenten, das Enzymsystem zur Bildung von NO<sup>•</sup> (eNOS) und das Enzymsystem zur Transduktion des NO<sup>•</sup>-Signals (sGC) untersucht.

Als wesentliches Ergebnis kann festgehalten werden, dass beide Enzymsysteme durch den Einfluss reaktiver Sauerstoffverbindungen auf die NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktions-Kaskade in ihrer Funktionalität geschädigt werden.

## 6.1 Mechanismus der endothelialen Dysfunktion bei Hypertonie

Es ist bekannt, dass die Hypertonie mit einer Verminderung der endothelabhängigen Relaxation verbunden ist (105;131). Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Störung ist aber nur unvollständig geklärt. Bisherige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die endogene NO<sup>•</sup>-Bildung reduziert ist und neu gebildetes NO<sup>•</sup> inaktiviert wird (79;106). Dadurch reduziert sich die Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> und die Effizienz des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges.

Zu den wichtigsten Mechanismen, die endogen gebildetes NO<sup>•</sup> inaktivieren, zählt die Oxidation von NO<sup>•</sup> durch reaktive Sauerstoffverbindungen wie Superoxid. Eine der wichtigsten Quellen von Superoxid in vaskulären Endothel- bzw. glatten Muskelzellen ist die membranständige NAD(P)H-Oxidase. Das Enzym besteht aus zwei membrangebundenen Untereinheiten (p22phox, gp91phox/mox-1) und zwei zytosolischen Untereinheiten (p47phox, p67phox) (51). Endothelzellen exprimieren alle Untereinheiten der klassischen Phagozyten-NAD(P)H-Oxidase, während glatte Muskelzellen die kürzlich entdeckte Untereinheit "mitogen oxidase-1" (mox-1) statt gp91phox exprimieren.

In isolierten Endothelzellen aus spontanhypertensiven Ratten konnte bereits eine geringere NO<sup>•</sup>-Bildung direkt mit einer erhöhten Superoxid-Produktion in Verbindung gebracht werden (52). Darüber hinaus wurde in dem gleichen Tiermodell eine erhöhte Expression der gp91phox-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase nachgewiesen (112). Somit wird angenommen, dass die erhöhte vaskuläre Bildung von Superoxidradikalen bei Hypertonie dazu beiträgt, eine endotheliale Dysfunktion auszulösen und zu unterhalten. Es galt nun den Mechanismus zu untersuchen, der dem Einfluss des erhöhten vaskulären oxidativen Stresses

auf die Transduktion des NO<sup>•</sup>-Signals zu Grunde liegt. Diese Frage ist zum einen wegen der möglichen Beteiligung an der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion bei Hypertonie von Bedeutung, außerdem könnte eine Schädigung des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges aber auch zu einer verminderten Wirkung von therapeutisch angewendetem NO<sup>•</sup> führen.

Die lösliche Guanylylzyklase ist das zentrale Enzym des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges (114). Da sie sehr oxidationsempfindlich ist (108), wurde zunächst untersucht, wie sich die Aktivität der sGC in zytosolischen Präparationen aus der Lunge und Aorta von gealterten spontan hypertensiven Ratten (SHR15) im Vergleich zu normalen Wistar Kyoto Ratten (WIS15) verhält. Wie in Abb. 21 dargestellt, fand sich in den zytosolischen Präparationen der SHR15 eine deutlich geringere sGC-Aktivität als in den WIS15. Das bedeutet, dass in großen Leitung- und Widerstandsgefäßen hypertensiver Ratten die spezifische Aktivität der sGC deutlich vermindert ist. Die Stimulation der zytosolischen sGC-Präparationen der WIS15 mit dem NO-Donator SNAP führte zu einer dreifach höheren cGMP-Produktion als in SHR15. Die EC<sub>50</sub>-Werte waren in beiden Fällen allerdings vergleichbar, so dass die Sensitivität der sGC gegenüber dem stimulierenden Effekt durch NO<sup>•</sup> unverändert blieb. Eine mögliche Erklärung für die gefundene reduzierte sGC-Aktivität in den zytosolischen Präparationen der SHR15 könnte eine geringere Expression des Proteins bei Hypertonie sein.

Die vergleichenden Western Blot Analysen aus der Aorta von WIS15 und SHR15 bestätigten diese Vermutung. Sie zeigten nahezu eine Halbierung der sGC-Expression in SHR15-Präparationen. Das Ergebnis zeigt, dass die gefundene Hemmung der maximalen cGMP-Bildungsrate und die unveränderte NO<sup>•</sup>-Sensitivität auf einer verminderten Proteinexpression beruhen. Die Daten stimmen auch mit kürzlich publizierten Studien überein, die in verschiedenen Hypertonie-Modellen eine Verminderung der sGC-Expression in der Rattenaorten beschreiben (74;148). Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass bei Hypertonie eine Schädigung des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges in Leitungs- und Widerstandsarterien vorliegt, die durch eine geringere Expression des Schlüsselenzyms sGC verursacht wird.

Bislang ist über die Regulation der sGC nur wenig bekannt (40;133;162). Die gefundene erhöhte Superoxid-Produktion in den Aorten von SHR15 lässt vermuten, dass durch Superoxidradikale die Expression der sGC reduziert wird. Obwohl gezeigt wurde, dass NO<sup>•</sup> durch negative Rückkopplungshemmung die sGC-Expression konzentrationsabhängig reduziert (40), scheint dieser Mechanismus hier nicht zu greifen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Menge an bioverfügbarem NO<sup>•</sup> in der Gefäßwand von SHR15 deutlich verringert ist (112). Nach publizierten Daten zur Rolle von NO<sup>•</sup> auf die sGC-Expression wäre demnach zu erwarten, dass die sGC-Expression in Folge der geringeren NO<sup>•</sup>-Bioverfügbarkeit ansteigt. Da dies nicht gefunden wurde, scheint der Effekt einer erhöhten vaskulären Superoxid-Produktion auf die sGC-Expression deutlich stärker ausgeprägt zu sein, als die Regulation der sGC durch NO<sup>•</sup>. Ferner könnten auch genetische Unterschiede zwischen SHR und WIS bei den Ergebnissen eine Rolle spielen.

## **6.2 Schädigung des vaskulären NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges durch reaktive Sauerstoffverbindungen**

Die Ergebnisse zur Expression der sGC bei Hypertonie könnten durch einen direkten toxischen Einfluss der Superoxidradikale auf den NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweg erklärt werden. Um einen solchen Mechanismus zu untersuchen, wurden Inkubationsexperimente mit Superoxid, NO<sup>•</sup> und deren Reaktionsprodukt Peroxynitrit durchgeführt. Eine entscheidende Frage hierbei war, welchen Einfluss extrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffverbindungen überhaupt haben. Denn es ist bekannt, dass gerade die Endothelzellen das meiste Superoxid generieren (51), während die eingeschränkte Transduktion des NO<sup>•</sup>-Signals auf die sGC bei Hypertonie in den glatten Muskelzellen beobachtet wurde (80;112;148). Obwohl Superoxid und Peroxynitrit hydrophile Anionen sind, und die Zellmembran nur zu einem sehr geringen Prozentsatz durchdringen können, sind die Ergebnisse dieser Inkubationsexperimente von Bedeutung für die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion. Man muss bedenken, dass in vivo der toxische Einfluss von reaktiven Sauerstoffverbindungen in den geschädigten Gefäßen über Jahre hinweg erfolgt und so selbst geringe Mengen von extrazellulärem Superoxid und Peroxynitrit die NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktion verändern könnten.

### 6.2.1 Einfluss von extrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die Aktivität und Expression der sGC

In dieser Arbeit sind die Effekte von Superoxid,  $\text{NO}^\bullet$  und Peroxynitrit auf die Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase untersucht worden. Dabei wurde eine Inkubationsdauer von vier Stunden gewählt, bei der eine bestimmte Konzentration der reaktiven Sauerstoffverbindung auf das Gewebe einwirkte. Wie die in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, beeinflusste extrazelluläres Superoxid die Aktivität und Expression isolierter sGC unter den gewählten Bedingungen nicht. Dieses Ergebnis zeigt, dass der toxische Einfluss von Superoxidradikalen auf die sGC bzw. den  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$ -Signaltransduktionsweg wahrscheinlich sehr gering ist. In den Inkubationsexperimenten wurden zwar ca. 25  $\mu\text{M}$  Superoxid pro Minute gebildet, was die in vivo vorkommende Superoxidbildung bei weitem überschreitet (51), allerdings wurde nur für den Zeitraum von vier Stunden inkubiert.

Im Gegensatz dazu, führte die Inkubation mit 7,5  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit/min zu einer deutlichen Verschlechterung der katalytischen Aktivität der sGC (siehe Abb. 25). In der vorliegenden Untersuchung sind Rattenaortenringe einem simplen System ausgesetzt worden, das kontinuierlich Peroxynitrit generiert. Wie in den Methoden beschrieben, wurden zwei verschiedene Verfahren zur in-vitro Generierung von Peroxynitrit angewandt. Die in Abb. 6 dargestellte Unterdrückung des  $\text{NO}^\bullet$ -Signals bei gleichzeitiger Gabe von NO-Donator und Superoxid-Produktion ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das freigesetzte  $\text{NO}^\bullet$  quantitativ in Peroxynitrit umgewandelt wurde. Die nach vier Stunden Inkubation beobachtete Reduktion der katalytischen Aktivität der sGC war somit allein der Bildung von Peroxynitrit zuzuschreiben. Nur die Inkubation mit dem SPER/NO/Lumazin-System, welches konstant 7,5  $\mu\text{M}$  Peroxynitrit/min bildete (siehe Methoden Abb. 9), führte zu einer Hemmung der sGC Aktivität. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass Superoxid möglicherweise zu diesem Effekt beigetragen hat, erscheint dies vor dem Hintergrund, dass Superoxid alleine keine Veränderungen der sGC verursacht hat, sehr unwahrscheinlich.

Peroxynitrit wird sehr schnell aus den Radikalen  $\text{NO}^\bullet$  und Superoxid gebildet (6;49;83). Das Anion sowie auch die protonierte Form, Peroxosalpetrige Säure, sind hochreaktive Verbindungen. Im Blut, in Geweben oder physiologischen Pufferlösungen reagiert

Peroxynitrit hauptsächlich mit Kohlenstoffdioxid, Hydrogencarbonat oder freien Thiolen (82). Somit hat eine Bolusapplikation von Peroxynitrit-haltigen Lösungen wegen der kurzen Halbwertszeit nur einen kurzzeitigen Einfluss auf die Gewebe und die Verwendung eines Peroxynitrit-generierenden Systems schien sinnvoller. Die pathophysiologischen Bedingungen bei Hypertonie oder Atherosklerose, sind schließlich auch durch andauernde vaskuläre Bildung von Peroxynitrit durch den erhöhten oxidativen Stress gekennzeichnet. Es gilt ferner zu bedenken, dass Superoxid zwar 3-6 mal schneller mit  $\text{NO}^\bullet$  reagiert als mit Superoxiddismutase (29;49;71), die Bildung von Peroxynitrit jedoch durch die hohe Konzentrationen an Superoxiddismutase in intakten Zellen (ca. 10  $\mu\text{M}$ ) deutlich vermindert wird. Der toxische Einfluss von Peroxynitrit in der Gefäßwand stammt also mit großer Wahrscheinlichkeit hauptsächlich von einer extrazellulären Bildung. Daher sind die gefundenen Effekte von extrazellulär gebildetem Peroxynitrit von entscheidender Bedeutung für die Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen.

Es wurde gezeigt, dass die Peroxosalpetrige Säure sowie das  $\text{NO}_2$ -Molekül, welches beim Zerfall der Säure entsteht, biologische Membranen relativ unbehindert durchdringen können. Im Gegensatz dazu stellt die Zellmembran eine fast unüberwindliche Barriere für das anionische Carbonatradikal sowie für Peroxynitrit selbst dar (70;146). Am Beispiel roter Blutkörperchen wurde gezeigt, dass Peroxynitrit zu etwa fünf Prozent durch den Dicarbonat/Chlorid-Austauscher die Zellmembran überwinden kann (34). Anhand dieser Daten wird vermutet, dass weniger Peroxynitrit selbst, sondern eher seine Reaktionsprodukte die beobachtete Hemmung der sGC Aktivität ausgelöst haben. Dazu gehört neben der Peroxosalpetrigen Säure das sich in vivo sehr schnell bildende Addukt aus Peroxynitrit und Kohlenstoffdioxid ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), welches sehr instabil ist und rasch zu  $\text{NO}_2$ -Radikalen und  $\text{CO}_3^-$  zerfällt (11;97;135). Die Zerfallsprodukte des Peroxynitrit-Carbonat-Adduktes weisen ein hohes Potential an Oxidation freier Thiole auf, was zur Bildung von Thiyl-, Sulfinyl- und Disulfidradikalen führt (10). Auf diese Weise könnte also der schädigende Einfluss von extrazellulärem Peroxynitrit auf die katalytische Aktivität der sGC vermittelt worden sein.

Die Hemmung der katalytischen Aktivität der sGC durch Peroxynitrit kann dagegen nicht durch eine Verminderung der sGC-Expression erklärt werden. Die hierzu durchgeführten Western Blot Analysen zeigten keine Reduktion, sondern eher einen Trend zur erhöhten Expression der sGC (siehe Abb. 26). Die Daten weisen darauf hin, dass der Einfluss von Peroxynitrit auf die sGC wahrscheinlich durch eine direkte Oxidation des Proteins verursacht wird, die zu einer Hemmung der durch  $\text{NO}^\bullet$  induzierten katalytischen Aktivität führt, ohne die Expression zu verändern. Diese Sichtweise stimmt auch mit der gut bekannten Tatsache überein, dass die sGC besonders empfindlich gegenüber oxidativen Einflüssen ist (108). Zudem ist bekannt, dass die sGC viele oxidationsempfindliche Thiolgruppen sowie ein Häm trägt, beide Strukturmerkmale sind essentiell für die katalytische Aktivität (76). So wurde gezeigt, dass es in gereinigter sGC durch Bolus-Gaben von Peroxynitrit zu einer spezifischen Hemmung der  $\text{NO}^\bullet$ -abhängigen Aktivierung kommt, während die  $\text{NO}^\bullet$ -unabhängige Aktivierung, z.B. durch Protoporphyrin IX unbeeinflusst bleibt (119). Wir vermuten, dass reaktive Sauerstoffverbindungen, die von extrazellulärem Peroxynitrit stammen, die intrazellulär lokalisierte sGC direkt oxidieren, wenn Peroxynitrit kontinuierlich anwesend ist. Welche Reaktionen letztlich zur Hemmung der katalytischen Aktivität der sGC führen, lässt sich aus den hier erarbeiteten Daten leider nicht entnehmen. Mögliche Reaktionen wären eine Tyrosin-Nitrierung, eine Dithyrosin-Bildung und eine Oxidation freier Thiolgruppen (10;65;136;139).

Es ist nicht anzunehmen, dass die Hemmung der sGC-Aktivität von den einzelnen Komponenten des Peroxynitrit-generierenden Systems vermittelt wurde. Dies zeigen nicht nur die bereits beschriebenen Versuche mit extrazellulärem Superoxid, sondern auch die Versuche mit dem NO-Donator SPER/NO. Wie in Abb. 27 dargestellt hatte  $\text{NO}^\bullet$ , im Gegensatz zu Superoxidradikalen, einen ausgeprägten Effekt auf die sGC. Es zeigte sich sowohl eine deutlich geringere spezifische sGC-Aktivität, als auch eine Verminderung der Expression des Proteins. Diese Ergebnisse stimmen gut mit früheren Befunden überein (40;80;111). Somit wurde gezeigt, dass die Expression der sGC über eine Rückkopplungshemmung durch  $\text{NO}^\bullet$  reguliert wird. Der Effekt von  $\text{NO}^\bullet$  auf die sGC-Expression ist abhängig von der cGMP-Bildung und kann somit zu einer Hemmung der Transkription und Translation führen. So ist beschrieben, dass die Stabilität der sGC-mRNA durch  $\text{NO}^\bullet$  vermindert wird (40). In den Inkubationsexperimenten mit Peroxynitrit wurde das

NO<sup>•</sup>-Signal des SPER/NO unterdrückt, was sich nicht nur bei der Kontrollmessung mit der NO-Elektrode zeigt (siehe Abb. 6), sondern auch dadurch äußert, dass keine Rückkopplungshemmung der sGC-Expression durch NO<sup>•</sup> gefunden wurde. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die nach Inkubation mit dem Peroxynitrit-generierenden System gefundenen Effekte auf die vaskuläre sGC vollständig dem Peroxynitrit sowie den daraus entstehenden reaktiven Sauerstoffverbindungen zugeschrieben werden können.

### **6.2.2 Einfluss von intrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die Aktivität und Expression der sGC**

Für die Vermittlung des endothelialen NO<sup>•</sup>-Signals im Hinblick auf die Vasorelaxation spielt die sGC in den glatten Muskelzellen der Media eine wesentliche Rolle. Die bisher beschriebenen Versuche zum Einfluss von extrazellulären Sauerstoffverbindungen haben nicht berücksichtigt, dass auch in den glatten Muskelzellen der Media die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen bei verschiedenen Erkrankungen ansteigen kann. So zeigen Versuche an isolierten Aorten von SHR15, dass wahrscheinlich mehr als die Hälfte der reaktiven Sauerstoffverbindungen aus Quellen in der Media bzw. Adventitia der Gefäßsegmente stammen (80). Die Entfernung des Endothels führte hier nämlich nur zu einer etwa 40 %igen Reduktion der vaskulären Superoxidbildung bei SHR15. Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Berichten überein, die eine funktionelle NAD(P)H-Oxidase in glatter Muskulatur nachweisen konnten (51). Darüber hinaus wurde berichtet, dass auch Radikalquellen in der Adventitia existieren (129). Deshalb wurden zusätzlich die Effekte einer Erhöhung der intrazellulären Superoxidbildung untersucht.

Es ist schon lange bekannt, dass das Chinon LY 83583 über die Bildung von intrazellulärem Superoxid die sGC-Aktivität hemmt (117). LY 83583 kann durch die Cytochrom P450-Reduktase oder die NAD(P)H: Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase) reduziert werden, wobei gleichzeitig Superoxid entsteht (87;115). Die Ergebnisse der Inkubation in Gegenwart von LY 83583 bestätigen diese früheren Befunde. Isolierte Segmente der Aorta der Ratte zeigten eine fast dreifach höhere Bildung von Superoxidradikalen in Gegenwart von 10 µM LY 83583, während in Abwesenheit von Gewebe keine erhöhte Superoxid-Produktion gemessen werden konnte (88). Die vierstündige Inkubation der Rattenaorten mit

10  $\mu\text{M}$  LY 83583 führte zu einer massiven (fast 80 %igen) Hemmung der katalytischen Aktivität der sGC (Abb. 28). Im Gegensatz dazu kam es gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der sGC-Expression. Diese Daten lassen vermuten, dass die intrazelluläre Bildung von Superoxidradikalen auch in Abwesenheit von  $\text{NO}^\bullet$  zu einer Erhöhung der sGC-Expression führen kann. Isolierte Aortenringe normaler Ratten weisen nämlich nur eine sehr geringe maximale  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration auf, da unter diesen Bedingungen jegliche Stimulation zur endothelialen  $\text{NO}^\bullet$ -Bildung fehlt. Messungen an ruhenden Endothelzellen ergaben eine  $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration von nur ca. 50 nM auf der Zelloberfläche (99). Insofern kann die Heraufregulation der sGC-Expression entweder durch einen  $\text{NO}^\bullet$ -Mangel (Rückkopplungshemmung) oder durch einen direkten Einfluss von Superoxid verursacht sein.

Im Hinblick auf die bei Hypertonie erhaltenen Ergebnisse zur Aktivität und Expression der sGC scheint der direkte Einfluss von Superoxidradikalen alleine auf die sGC nur gering zu sein. Obwohl bei dieser Erkrankung eine massive Erhöhung der Superoxid-Produktion gefunden wurde, konnten die reduzierte sGC-Aktivität und die Halbierung der sGC-Expression bei Hypertonie in den *in vitro* Inkubationsversuchen mit Superoxid nicht nachgestellt werden (112). Es ist durchaus möglich, dass bei Hypertonie die Verminderung der sGC-Aktivität und Expression völlig unabhängig von dem erhöhten vaskulären oxidativen Stress reguliert wird. Entsprechend der Erkenntnisse zur negativen Rückkopplung der sGC-Expression durch  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$  wäre eigentlich eine Erhöhung der sGC-Expression durch den starken oxidativen Stress und dem daraus resultierenden Mangel an bioverfügbarem  $\text{NO}^\bullet$  zu erwarten gewesen. Somit konnten die Inkubationsexperimente mit den reaktiven Sauerstoffverbindungen zwar neue Erkenntnisse über den  $\text{NO}^\bullet/\text{cGMP}$ -Signaltransduktionsweg liefern, sie konnten bei einem Krankheitsmodell wie der SHR Ratte aber nur bedingt zur Klärung beitragen. Daher wurde in einem weiteren Modell für eine Gefäßerkrankung, der Atherosklerose beim cholesterolfütterten Kaninchen, untersucht, inwieweit hier die bisher gewonnenen Erkenntnisse die pathophysiologischen Gefäßveränderung besser erklären können.

### 6.3 Veränderungen des vaskulären NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges bei Atherosklerose

Im Gegensatz zur Hypertonie ist die Atherosklerose durch starke morphologische Veränderungen an bestimmten Stellen der Gefäßwand charakterisiert. Mit zunehmendem Schweregrad finden sich einfache Akkumulationen von Fett bis hin zu komplizierten Läsionen mit Kalkeinlagerung und fibröser Kappe, dem atherosklerotischen Plaque (147). Das Modell des cholesterolgefütterten Kaninchens kommt der Entwicklung der menschlichen Atherosklerose sehr nahe, wenn man für längere Zeit (4-6 Monate) mit niedrigen Dosierungen von Cholesterol ( $\leq 0,75\%$ ) füttert (30;31). Die Atherosklerose war auch die erste Erkrankung, die mit einer Hemmung der endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin in Verbindung gebracht werden konnte. Als tierexperimentelles Modell kam hier ebenfalls das cholesterolgefütterte Kaninchen zum Tragen (66). Die dort gewonnenen Erkenntnisse ließen sich auf die Situation bei Koronarkranken übertragen (42;96). Daher ist das Kaninchenmodell gerade im Hinblick auf die Erforschung der vaskulären Pathophysiologie innerhalb der Gefäßwand, die der Entwicklung einer Atherosklerose zugrunde liegt, hervorragend geeignet.

Die Untersuchungen an diesem Modell zeigten, dass eine Hypercholesterolämie und die daraus folgenden morphologischen Veränderungen der Gefäßwand eine deutliche Erhöhung der sGC-Expression zur Folge haben. Nach 16 Wochen Cholesterolfütterung wurde ein nahezu 4-facher sGC-Proteingehalt in den Kaninchenaorten gemessen im Vergleich zur Standarddiät (siehe 3.3.1). Im Gegensatz dazu war die sGC-Aktivität nicht 4-fach erhöht, sondern blieb nahezu unverändert (Abb. 29). Diese Daten lassen vermuten, dass die Hypercholesterolämie eine Störung des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges auslöst, die durch Überexpression einer dysfunktionalen sGC gekennzeichnet ist. Funktionelle Konsequenzen waren eine zehnfach reduzierte Vasorelaxation gegenüber dem spontanen NO-Donator SNAP in 16 bzw. 32 Wochen Cholesterol-gefütterten Kaninchen, und das Absinken der endothelabhängigen Vasorelaxation gegenüber Acetylcholin von 70 % auf 0 % (88).

Wie oben bereits dargestellt kann die Expression der sGC in glatten Muskelzellen und isolierten Gefäßsegmenten durch NO<sup>•</sup> moduliert werden (40;180). Demnach kann angenommen werden, dass eine Hochregulation der sGC-Expression die Folge einer reduzierten Bioverfügbarkeit von endogenem NO<sup>•</sup> ist, wie man sie bei atherosklerotischen

Gefäßwandveränderungen sowohl beim Kaninchen als auch beim Menschen nachweisen konnte. Insofern wäre also die Hochregulation der sGC bei Hypercholesterolämie durch die geringere Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}^\bullet$  erklärbar. Ferner sollte mitberücksichtigt werden, dass die bei diesem Tierversuch nachgewiesene Steigerung der Superoxidradikal-Produktion ebenfalls an der erhöhten sGC-Expression beteiligt sein könnte. So könnte eine radikalinduzierte Oxidation von  $\text{NO}^\bullet$  stattgefunden haben oder, wie bereits oben diskutiert, die Superoxidradikale direkt Einfluss auf die sGC-Expression ausgeübt haben. Es ist ebenfalls gut möglich, dass eine Reihe anderer Mechanismen, die im Rahmen von Entzündung und Zytokinfreisetzung bei Atherosklerose stattfinden, zu den beschriebenen Änderungen der sGC-Expression bei Atherosklerose beigetragen haben. So ist z.B. bei stark ausgeprägter Nitratintoleranz ein ähnlicher Anstieg der Superoxid-Produktion wie bei der Atherosklerose zu beobachten (120). Unter solchen Bedingungen kommt es allerdings nur zu einer Verdopplung und nicht zu einer Vervierfachung der sGC-Expression (118).

Eine Schlussfolgerung dieser Studie ist, dass die sGC offensichtlich geschädigt und damit dysfunktional ist. Dies ergibt sich direkt aus der Diskrepanz zwischen dem deutlichen Anstieg der sGC-Expression und der dabei unveränderten spezifischen sGC-Aktivität (siehe Abb. 29). Da die Überexpression des Proteins in derselben zytosolischen Fraktion keinen Anstieg der sGC-Aktivität auslöste, wird angenommen, dass ein Teil der exprimierten sGC dysfunktional ist. Andere publizierte Studien konnten ebenso zeigen, dass die basale Aktivität und  $\text{NO}^\bullet$ -unabhängige Aktivierungsmechanismen wie die Stimulation durch Protoporphyrin IX oder YC-1 bei Hypercholesterolämie eingeschränkt waren (43).

Aus den hier durchgeführten Experimenten kann kein neuer Mechanismus für die Schädigung der sGC-Funktion bei Hypercholesterolämie definiert werden. In Frage kommen so verschiedene Möglichkeiten wie die Hemmung der Dimerisierung, oxidative Modifikationen (Hämoxidation, Thioloxydation, etc.), die Bildung eines endogenen Inhibitors, eine veränderte Substratbindung oder auch eine verminderte Bindung von Kofaktoren. Einige bisher publizierte Untersuchungen lassen vermuten, dass oxidativer Stress in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung ist. So konnte gezeigt werden, dass oxidiertes LDL, das auch im Modell des cholesterolfütterten Kaninchens nachweisbar ist (54), zu einer Hemmung der  $\text{NO}^\bullet$ -abhängigen sGC-Aktivierung führt (156). Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt

werden, dass Peroxynitrit, welches ebenfalls in cholesterolgefütterten Kaninchen entsteht, einen klaren Hemmeffekt auf die sGC-Aktivität hat.

Insgesamt kann man also sagen, dass die Inkubationsexperimente zum Einfluss reaktiver Sauerstoffverbindungen eher den Veränderungen der sGC-Aktivität und -Expression bei Atherosklerose gleichen, als denen bei Hypertonie. Die bei Atherosklerose messbaren Veränderungen deuten auf eine Kompensationsreaktion der Gefäßwand hin. Mit fortschreitender Atherosklerose kommt es zu erhöhtem oxidativen Stress, der wahrscheinlich zu einer Oxidation der sGC und damit zu einer Schädigung des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges führt. Sowohl die geringere Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup>, als auch die Superoxid-Produktion, leiten damit eine Kompensationsreaktion ein. Es wird versucht, die oxidativ geschädigte dysfunktionale sGC durch eine gesteigerte Expression auszugleichen, um die Ansprechbarkeit des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges aufrecht zu erhalten.

Immunhistochemische Daten zeigen, dass durch Hypercholesterolämie das Verteilungsmuster der sGC in der Media und Adventitia kaum verändert wird. Im Gegensatz dazu wurde eine starke sGC-Färbung in den Intima-Läsionen beobachtet (88). Diese Daten lassen vermuten, dass ein großer Anteil der überexprimierten und zum Teil dysfunktionalen sGC in den Intima-Plaques lokalisiert ist. Gerade dort ist der oxidative Stress, die Entzündungsreaktion und die Zytokinkonzentration vergleichsweise hoch (147). Es wäre daher möglich, dass die bei Atherosklerose beobachteten Schäden durch den Verlust der sGC-abhängigen antiproliferativen und antimigratorischen Antwort der glatten Muskelzellen auf das endotheliale NO<sup>•</sup> zustande kommt. Somit würde die hier beschriebene oxidative Schädigung der sGC eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose spielen. Dafür sprechen Studien wo ein Gentransfer der sGC die Bildung der Neointima nach balloninduzierten intraarteriellen Verletzungen verringern konnte (164).

Zusammenfassend wird vermutet, dass die Hypercholesterolämie bzw. Atherosklerose innerhalb der Gefäßwand eine Umgebung schafft, die die Funktion bereits gebildeter sGC oxidativ hemmt. In der Folge kommt es zu einem kompensatorischen Anstieg der sGC-Expression um die Ansprechbarkeit des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges zu erhalten. Es wäre denkbar, dass dieser Pathomechanismus die endotheliale Dysfunktion bei Atherosklerose verursacht.

## 6.4 Die endotheliale NO-Synthase als Quelle reaktiver Sauerstoffverbindungen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung zum Einfluss reaktiver Sauerstoffverbindungen auf das Enzymsystem der NO<sup>•</sup>-Bildung, die eNOS. Eine erhöhte Radikalbildung und gleichzeitig das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion ließen einen Zusammenhang vermuten. Das bislang am besten beschriebene enzymatische System zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in Endothelzellen ist die NADPH-Oxidase (51). Daneben sind unter anderem auch Cyclooxygenase, Xanthinoxidase und mitochondriale Oxidasen am endothelialen oxidativen Stress beteiligt. Interessant ist, dass im Verlauf dieser Arbeit einige Berichte über die eNOS als eine weitere endotheliale Radikalquelle veröffentlicht wurden (20).

Studien mit der neuronalen NOS, darunter Radikalmessungen mit ESR (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie), haben schon früh gezeigt, dass die Oxidation von L-Arginin nur dann unter Bildung der Produkte NO<sup>•</sup> und L-Citrullin verläuft, wenn ausreichend BH<sub>4</sub> vorhanden ist. Bei BH<sub>4</sub>-Mangel ist die eNOS in ihrer Funktion verändert. Sie bildet dann selbst Superoxid und Wasserstoffperoxid anstatt NO<sup>•</sup> (57;137;174). Man spricht heute in diesem Fall von einer "entkoppelten" eNOS. Es wurde auch gezeigt, dass die Superoxidbildung der "entkoppelten" eNOS durch BH<sub>4</sub>-Zugabe wieder vollständig in eine NO<sup>•</sup> und L-Citrullin-Produktion umgewandelt werden konnte (174).

Theoretisch weist die Superoxidbildung durch die eNOS ein höheres Gefahrenpotential für die Endothelfunktion auf als z.B. die vermehrte O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung durch NADPH-Oxidasen. Solche Oxidasen sind in bestimmter räumlicher Entfernung von der eNOS lokalisiert und das gebildete O<sub>2</sub><sup>•-</sup> kann in stärkerem Maße durch Superoxiddismutasen umgewandelt werden. Im Gegensatz dazu sind normale und entkoppelte eNOS direkt benachbart, sodass es möglicherweise zu einer quantitativen Umsetzung zwischen NO<sup>•</sup> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu Peroxynitrit kommt, das dann wiederum zur Entkopplung funktionstüchtiger eNOS führen könnte.

Es ist also möglich, dass eine entkoppelte eNOS vor allem an fortgeschrittenem oxidativen Stress in den Endothelzellen wesentlich beteiligt ist. So wäre denkbar, dass eine initial vermehrte Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer Erhöhung der endothelialen Peroxynitrit-Konzentration führt, welche in der Folge eine Schädigung der eNOS auslöst. Hierfür spricht eine Untersuchung, in der Peroxynitrit  $\text{BH}_4$  oxidiert und damit die eNOS entkoppeln könnte (91). Andererseits ist auch denkbar, dass zwar ausreichend  $\text{BH}_4$  vorhanden ist, die Bindung von  $\text{BH}_4$  an die eNOS aber irgendwie behindert ist. Dies könnte z.B. durch oxidative Veränderungen verschiedener Aminosäuren des Enzyms verursacht sein.

Nach bisherigen Erkenntnissen kommt einer zu paarweise angeordneten Cysteinresten tetrahedral koordinierte Zinkbindung eine entscheidende Bedeutung für die Bindung von  $\text{BH}_4$  zu (siehe Abb. 30). Die Binderegion für Zink liegt zwischen den Aminosäuren Cystein 96 und Cystein 101 (141). Die wesentliche Aufgabe der Zinkbindung ist, durch eine spezielle Konformation die Bildung des katalytisch aktiven eNOS-Dimers zu ermöglichen. Bei intaktem Zink-Cystein-Komplex entsteht ein bestimmter Abstand vom katalytischen Zentrum zu den direkt benachbarten Aminosäuren und der Zinkbindung. So stabilisiert diese Konformation die richtige Orientierung von  $\text{BH}_4$  und fördert die Bindung des Kofaktors im Enzym, an welcher die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von  $\text{BH}_4$  zu Serin 104 beteiligt ist (141) (Abb. 30).

In einer früheren Arbeit wurde bereits eine Cystein 99-Mutante der menschlichen eNOS mit einer geringeren  $\text{BH}_4$ -Affinität beschrieben (23). Allerdings zeigte diese Mutante eine große Instabilität, eine geringe katalytische Aktivität und einen Häm-Verlust. Bei dieser Mutante ließ sich, im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle, kaum eine Bindung von  $\text{BH}_4$  nachweisen. Eine verminderte  $\text{BH}_4$ -Bindung kann sich auch aus einer Hemmung der Substratbindung ergeben. Nach Literaturdaten weist eine Mutante der menschlichen neuronalen NOS mit verminderter Affinität gegenüber L-Arginin auch eine verminderte Bindung von  $\text{BH}_4$  auf (101). Schließlich wurde erst kürzlich beschrieben, dass für die Entkopplung der eNOS wahrscheinlich nicht die Oxidation von  $\text{BH}_4$ , sondern viel eher die Oxidation der Zinkbindenden Cysteine von Bedeutung ist (191).

Im Fall der bovinen eNOS finden sich im Bereich der Zinkbindung drei vergleichsweise oxidationsempfindliche Cysteine: Cystein 96, Cystein 100 und Cystein 101. Ziel dieser Arbeit war es, eine Mutante zu konstruieren, die eine geringere Affinität gegenüber BH<sub>4</sub> zeigt, jedoch gleichzeitig stabil genug ist, um deren Eigenschaften studieren zu können. Ausgehend von einem Aminosäuresequenzvergleich zwischen der humanen neuronalen NOS, der humanen eNOS und der bovinen eNOS, wurde die Mutation an dem Cystein 101 durchgeführt, welches wahrscheinlich dem Cystein 99 der humanen eNOS entspricht. Es ist ein Konstrukt kloniert worden, bei welchem mittels "primer-overlap-extension-PCR" eine gezielte Mutation an den Positionen 301 und 302 der DNA-Sequenz (TG gegen GC, ausgehend vom ATG) der eNOS durchgeführt wurde. Dies führt zu einem Austausch der Aminosäure Cystein 101 gegen Alanin.

Um die Eigenschaften der Mutante studieren zu können, wurde zuerst eine Expression in Sf 9-Zellen versucht. Es handelt sich dabei um Insektenzellen, die als Suspensionskultur wachsen und das gewünschte Enzym in großem Maßstab exprimieren. Die Sf 9-Zellen wurden schon erfolgreich zur Expression der neuronalen NOS benutzt (103). Leider war es nicht möglich, die eNOS-Mutante in den Zellen ausreichend stark zu exprimieren, so dass nicht genügend Protein für eine erste biochemische Charakterisierung zur Verfügung stand. Deshalb wurde eine stabil transfizierte HEK-Zelllinie mit der Mutante und der Wildtyp-eNOS etabliert. HEK-Zellen werden schon lange in der biomedizinischen Forschung verwendet. Ein Vorteil ist, dass es sich um humane Zellen handelt. Außerdem sind die Zellen sehr robust und vermehren sich gut. Sie exprimieren ohne eine Transfektion keine eNOS (Abb. 42). Im Gegensatz zu den Sf 9-Zellen war die Expression der mutierten C101A-eNOS in den HEK-Zellen sehr gut ausgeprägt. Wie in Abb. 42 und 43 dargestellt, gab es in den HEK-Zellen keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante im Hinblick auf ihre Expressionsstärke. Daher sind alle Experimente zur biochemischen Charakterisierung der Mutante mit dem in den HEK-Zellen exprimierten Enzym vorgenommen worden.

Zunächst wurde die Aktivität der eNOS mittels Citrullin-Assay (16) in Homogenaten der HEK-Zellen bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Mutante eine wesentlich geringere basale Aktivität aufweist. Immerhin war die basale Aktivität der Wildtyp-eNOS mehr als 6-fach größer. Dieser Befund alleine spricht noch nicht für eine spezifische, durch die Mutation verursachte Schädigung der BH<sub>4</sub>-Bindung bei der C101A-eNOS. Betrachtet man jedoch die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von ansteigenden BH<sub>4</sub>-Konzentrationen so zeigt sich zweierlei: Erstens reagieren sowohl die Mutante als auch der Wildtyp auf die BH<sub>4</sub>-Zugabe mit einer Steigerung ihrer spezifischen Aktivität. Zweitens wurde aber auch deutlich, dass die spezifische Aktivität der Mutante selbst bei hohen Konzentrationen an BH<sub>4</sub> (50 µM) deutlich niedriger ist, als die Aktivität der Wildtyp-eNOS. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mutation tatsächlich zu einer geringeren BH<sub>4</sub>-Affinität und einer niedrigeren katalytischen Aktivität der Mutante geführt hat.

Es ist bekannt, dass die normale eNOS BH<sub>4</sub> intrinsisch binden kann (104). Geht man davon aus, dass die Mutante eine geringere BH<sub>4</sub>-Bindung aufweist, lässt sich der Unterschied in der Basalaktivität dadurch leicht erklären. Die Mutante hat wahrscheinlich deshalb eine so niedrige basale Aktivität, weil sie kein oder kaum BH<sub>4</sub> gebunden hat. In ähnlicher Weise lässt sich auch der Unterschied bei der spezifischen Aktivität in Gegenwart von 50 µM BH<sub>4</sub> erklären. Danach führt die Mutation zu einer verminderten BH<sub>4</sub>-Affinität, die selbst bei hohen Konzentrationen von BH<sub>4</sub> nicht verbessert werden kann. Allerdings ist der Unterschied in der Aktivität zwischen der Mutante und dem Wildtyp bei 50 µM BH<sub>4</sub> deutlich niedriger als unter Basalbedingungen, nämlich nur noch etwa zweifach. Das spricht dafür, dass die C101A-eNOS zwar eine geringere BH<sub>4</sub>-Affinität aufweist, die Mutation aber nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms führt.

Wie bereits erwähnt wird die katalytische Aktivität der eNOS bei BH<sub>4</sub>-Defizienz deutlich beeinträchtigt (174). Statt NO<sup>•</sup> produziert die eNOS dann Superoxid. Wenn die hier beschriebene Mutation der eNOS tatsächlich zu einer Behinderung der BH<sub>4</sub>-Bindung geführt hat, sollte erwartet werden, dass die Mutante als Folge entkoppelt und Superoxid bildet. Um dies zu untersuchen, wurde die Bildung von Superoxid in intakten HEK-Zellen gemessen. Um Messartefakte zu minimieren und Superoxid als Radikal sicher identifizieren zu können, wurde die Messung mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) vorgenommen. Hierbei reagiert das Superoxidmolekül mit einem Spintrap zu einer stabilen, gut messbaren Form. Im Fall des

hier verwendeten Spintraps CMH entsteht  $CM^{\bullet}$  (durch homolytische Abspaltung der  $-OH$ -Gruppe), welches stabil ist und mit ESR vermessen werden kann. Wie die Messung ergab, produziert die Mutante tatsächlich mehr Superoxid als das Wildtyp-Enzym. Insgesamt war nahezu eine Verdopplung zu beobachten (Abb. 44). Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Mutation zu einer Entkopplung der eNOS geführt hat. Allerdings sollte man kritisch anmerken, dass die Experimente im Grunde andere Radikalquellen außer der C101A-eNOS, wie Xanthinoxidase, NADPH-Oxidase oder mitochondriale Oxidasen nicht ausschließen können. Durch andere Radikalquellen würde sich zwar die Superoxidbildung allgemein, nicht aber der gefundene Unterschied in der Superoxidproduktionsrate bei den Wildtyp-eNOS und den C101A-eNOS-transfizierten Zellen erklären lassen.

Anzunehmen ist, dass die Superoxid-Produktion in den Wildtyp-HEK-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit eben aus diesen anderen Quellen stammt, denn die normale eNOS bildet in Gegenwart ausreichender  $BH_4$ -Konzentrationen keine Superoxidradikale (174;175;186). Dafür spricht auch, dass die Erhöhung der Superoxidbildung in den Wildtyp-HEK-Zellen nach NOS-Hemmung durch L-NAME nicht signifikant war. Bisherige Untersuchungen an hochgereinigter Wildtyp-eNOS hatten entweder keinen Effekt oder eine Hemmung der eNOS-induzierten Superoxidbildung ergeben (174;186). In keinem Fall ist über eine Erhöhung der Superoxidbildung durch L-NAME berichtet worden. Dieser Befund ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass es nach Hemmung der Wildtyp-eNOS durch L-NAME zu einer Reduktion der  $NO^{\bullet}$ -Bildung kommt. Damit reduziert sich jedoch die auch in gesunden eNOS-haltigen Zellen in geringem Maße vorkommende Reaktion zwischen  $NO^{\bullet}$  und Superoxid unter Bildung von Peroxynitrit (7). In der Folge werden daher geringfügig mehr Superoxidmoleküle mit dem Spintrap reagieren und mittels ESR nachweisbar sein.

Die Ergebnisse mit der C101A-eNOS müssen anders betrachtet werden. Hier wurde eine deutlich erhöhte basale Bildung von Superoxid gefunden, die sich durch Ca-Ionophor A23187 leicht, aber nicht signifikant steigern ließ (Abb. 45). Entscheidend ist jedoch der Vergleich mit den Wildtyp-Zellen und hierbei sind die Ergebnisse eindeutig. So führt der NOS-Aktivator Ca-Ionophor zu einer Verstärkung des Unterschiedes in der Superoxidproduktion zwischen WT- und MT-transfizierten Zellen, während die Hemmung mit L-NAME den Unterschied vollständig aufhebt (Abb. 46). Beide Ergebnisse stimmen mit der Interpretation überein, dass die vermehrte Superoxidbildung in den C101A-eNOS-HEK-Zellen vor allem

auf der eNOS-Mutation beruht. Danach würde der Unterschied in der Superoxid-Produktion, der wahrscheinlich auf einer geringeren BH<sub>4</sub>-Affinität bei der C101A-eNOS beruht, durch eine Hemmung der eNOS deutlich reduziert werden. Genau dies ist in den Experimenten der Fall gewesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hier hergestellte Mutation C101A der eNOS zu einer Änderung der katalytischen Aktivität geführt hat, die mit der Bildung von Superoxid einhergeht. Vermutlich beruht diese Änderung auf einer Destabilisierung und/oder Aufhebung des Cystein 96- Cystein 101-Zinkkomplexes innerhalb des eNOS-Dimers. Die erhaltenen Daten lassen keine Schlussfolgerung zum Mechanismus der Bildung von Superoxid durch die mutierte eNOS zu. Es ist anzunehmen, dass die Superoxidbildung von jenen eNOS-Proteinen ausgeht, die kein BH<sub>4</sub> gebunden haben. Unter diesen Bedingungen kommt es wahrscheinlich zu einer Entkopplung der L-Arginin-Oxidation unter NADPH-Verbrauch, was einen Elektronentransfer zu molekularem Sauerstoff und die Bildung von Superoxid nach sich ziehen könnte (2;174).

Trotz der eindeutig nachweisbaren Induktion einer Superoxidbildung bei der Mutante war es notwendig, die Entkopplung der C101A-eNOS auch im Sinne einer Verminderung der NO<sup>•</sup>-Produktion zu untersuchen. Die NO<sup>•</sup>-Bildung wurde mittels ESR gemessen und als Zusatzexperiment zu den Aktivitätsmessungen durchgeführt, da hier die tatsächlich durch die eNOS gebildete Menge von NO<sup>•</sup> messbar ist. Bei der Bestimmung der eNOS-Aktivität mit dem Citrullin-Assay wird die spezifische Aktivität des Enzyms bestimmt, wobei jedoch die gebildete Menge L-Citrullin gemessen wird und nicht die tatsächlich freigesetzte Menge NO<sup>•</sup>.

Bei der durchgeführten NO<sup>•</sup>-Messung mittels ESR wurde mit einem speziellen kolloidalen Fe(DETC)<sub>2</sub>-Komplex die von der Wildtyp- und C101A-eNOS gebildete NO<sup>•</sup>-Menge bestimmt (73). Die Ergebnisse der Messung der NO<sup>•</sup>-Produktion in den HEK-Zellen bestätigten die Daten zur Aktivität der beiden Enzyme. Die mit der C101A-eNOS transfizierten HEK-Zellen zeigten eine nur halb so große NO<sup>•</sup>-Produktion im basalen Zustand. Die Stimulation der Wildtyp-eNOS mit Ca-Ionophor A23187 führte zu einer deutlichen Steigerung der gebildeten NO<sup>•</sup>-Menge, wogegen sich die NO<sup>•</sup>-Produktion der Mutante kaum steigern ließ und nicht einmal an den Basalwert der Wildtyp-NO<sup>•</sup>-Produktion heranreicht (Abb. 47). Diese Ergebnisse lassen sich mit den gefundenen Daten zur Aktivität

der Wildtyp- und C101A-eNOS gut erklären. Die C101A-eNOS zeigte nur eine halb so große spezifische Aktivität wie der Wildtyp und führte demnach auch nur zu einer halb so großen Menge an freigesetztem  $\text{NO}^\bullet$ .

Ein weiterer experimenteller Ansatz ging der Frage nach, ob und inwieweit die erhöhte Superoxidbildung durch die C101A-eNOS in HEK-Zellen zu Proteinschäden führt. Es wäre ja denkbar, dass die Menge des vermehrt gebildeten Superoxid in der Zelle rasch und effizient entgiftet wird und somit keinerlei toxischen Einfluss ausübt. Hierzu wurden mit der Methode des Oxyblot die Auswirkungen von Superoxid auf oxidative Modifikationen von Proteinen innerhalb der Zelle bestimmt. Es ist bekannt, dass freie Radikale trotz zellulärer Abwehrmechanismen zur Modifikation von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen führen können (22;32). An Proteinen finden sich solche Modifikationen vor allem in den Seitenketten. Es kommt zur Bildung von Carbonylgruppen, wie Aldehyde und Ketone, oder zur Ausbildung von zusätzlichen Disulfidbrücken beim Cystein (33). Mit dem Oxyblot, der über einen spezifischen Antikörper einen Teil solcher Modifikationen erfasst, konnte somit der Effekt von intrazellulärem Superoxid *in vivo* untersucht werden.

Das mehr als doppelt so starke Oxyblot-Signal bei den mit der Mutante transfizierten HEK-Zellen im Vergleich zu den nur mit Vektor oder dem Wildtyp transfizierten Zellen, macht den oxidativen Schaden an den Proteinen deutlich. Somit konnte gezeigt werden, dass die Proteine in den C101A-HEK-Zellen durch Oxidation modifiziert worden waren. Diese Veränderungen sind vermutlich von der vermehrten Superoxidbildung in den mit der Mutante transfizierten Zellen verursacht worden. Oxidative Proteinmodifikationen werden in einem bestimmten Ausmaß von vielen verschiedenen Faktoren aus dem normalen Zellmetabolismus verursacht (4;22;183). Dies erklärt den Nachweis solcher Modifikationen in Wildtyp-eNOS-transfizierten HEK-Zellen. Der große Unterschied in den detektierten Proteinschäden der mutierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp- und Vektor-Zellen, deutet darauf hin, dass die Transfektion der C101A-eNOS zu einer vermehrten oxidativen Proteinmodifikation geführt hat. Allerdings scheint der erhöhte oxidative Stress durch die C101A-eNOS kein hohes toxisches Ausmaß zu erreichen, denn die transfizierten Zellen zeigten keine offensichtlichen Veränderungen im Zytoskelett.

Mit der Mutation des Cystein 101 zu Alanin wurde die Zinkbindung der eNOS verändert. Eine Veränderung der Zinkbindung führt nach publizierten Daten zu einer Instabilität des Dimers (104;141). Es ließ sich zeigen, dass im Fall der eNOS die Stabilität des Dimers im SDS-Gel unter bestimmten Bedingungen dargestellt werden kann (72). Um die Dimerisierung der Wildtyp- und C101A-eNOS zu untersuchen wurden die beiden Enzyme aus den HEK-Zellen isoliert und aufgereinigt. Zunächst wurde erneut die spezifische Aktivität der isolierten Wildtyp- und C101A-eNOS in Abhängigkeit von BH<sub>4</sub> mittels Citrullin-Assay bestimmt. Die gefundene spezifische Aktivität der isolierten C101A-eNOS war wie schon in den Zellhomogenaten deutlich geringer als bei dem Wildtyp. Auch die Gabe von BH<sub>4</sub> konnte die Aktivität der mutierten eNOS nur bedingt steigern. Sie erreichte die spezifische Aktivität der Wildtyp eNOS weder basal noch bei maximaler Gabe von 50 µM BH<sub>4</sub>. Somit sind die Vermutungen, dass die Mutation der eNOS zu einer geringeren BH<sub>4</sub>-Affinität führt und in einer reduzierten spezifischen Aktivität resultiert auch am isolierten Enzym bestätigt worden.

Durch die Mutation des Cystein 101 kann der für das katalytisch aktive eNOS-Dimer strukturtypische tetraedrale Cystein-Zink-Komplex nicht mehr gebildet werden. Da, wie oben beschrieben, die Zinkbindung für die Dimerisierung und damit die katalytische Aktivität der eNOS sehr wichtig ist, wurde untersucht, ob die gefundene Einschränkung der katalytischen Aktivität mit einer gestörten Dimerisierung zusammenhängt. Wie in Abb. 53 dargestellt, zeigt die isolierte C101A-eNOS selbst bei hohen Gaben von BH<sub>4</sub> keine Dimerisierung. Dagegen lag der Wildtyp zunächst teilweise noch als Monomer vor, konnte aber durch Zugabe von BH<sub>4</sub> vollständig zur Dimerisierung angeregt werden. Diese Daten zeigen, dass die Mutation ganz offensichtlich zu einer Destabilisierung des katalytisch aktiven Dimers führt. Sie erklären auch, warum die Dimerbildung selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von BH<sub>4</sub> nicht induziert werden kann. Darüber hinaus bestätigen diese Experimente die deutliche Reduktion der Aktivität der C101A-eNOS selbst in Gegenwart von BH<sub>4</sub>-Sättigungskonzentrationen. Schließlich zeigen sie in Übereinstimmung mit der Analyse der Kristallstruktur auch, dass BH<sub>4</sub> nur dann die Dimerisierung beeinflussen kann, wenn ein tetraedraler Komplex von Cystein 96 und Cystein 101 beider Monomere mit Zink ausgebildet werden kann.

Die Daten zur Dimerisierung der aufgereinigten Wildtyp- und C101A-eNOS spiegeln allerdings nicht wieder, wie die Enzyme tatsächlich in den lebendigen Zellen vorliegen. Es ist wahrscheinlich, dass die C101A-eNOS in den HEK-Zellen noch zu einem gewissen Prozentsatz als Dimer vorliegt, denn es konnte ja noch Aktivität und auch NO<sup>•</sup>-Bildung gemessen werden. Die Tatsache, dass das isolierte mutierte Enzym in dem Western Blot (siehe Abb. 52), der direkt nach der Aufreinigung durchgeführt wurde, noch detektierbares Dimer zeigte, belegt diese Vermutung ebenfalls. Dennoch bleibt festzuhalten, dass C101A-eNOS-Dimere eine große Instabilität aufweisen. Dies ist mit einer zerstörten Zinkbindung erklärbar, bei der zwei Liganden (C101 für jedes Monomer) nicht mehr für die Ausbildung eines Komplexes zur Verfügung stehen. Ebenfalls verständlich wird die geringere Affinität gegenüber BH<sub>4</sub>, denn für die Stabilisierung von BH<sub>4</sub> und die richtige Orientierung in der eNOS ist ein intakter Zink-Komplex notwendig.

Die Untersuchungen zur C101A-eNOS-Mutante sind aus mehreren Gründen von klinischer Relevanz. Sie zeigen, dass eine Veränderung des Cystein-Zink-Komplexes der eNOS zur Entkopplung und zu endotheliale oxidativen Stress führt. Eine solche Mutante ermöglicht die Entwicklung eines neuen Tiermodells zur Untersuchung der Auswirkungen von isoliertem endothelialen oxidativen Stress in vivo. Die gefundenen Ergebnisse zeigen die therapeutische Bedeutung einer BH<sub>4</sub>-Gabe in einem anderem Licht.

Es sind eine Reihe verschiedener Polymorphismen des eNOS-Gens beschrieben (179). Am besten untersucht ist der Glu298Asp-Polymorphismus (178). Dieser Aminosäureaustausch beruht auf einem "single nucleotide polymorphism" (SNP), wobei an Position 894 der DNA (Exon 7) ein Austausch von Guanidin zu Thymin vorliegt. Es wurde gezeigt, dass dieser Polymorphismus die eNOS-Proteinstabilität reduziert und zu einer Verringerung der Lebensdauer der eNOS in der Zelle führt (170). Allerdings ist umstritten, ob dieser Polymorphismus Krankheitswert besitzt. In einigen Fällen wurde eine Assoziation mit dem Auftreten von Hypertonie, koronarer Herzerkrankung oder der Atherosklerose-Progression beschrieben (58;92;109;187), während andere Untersuchungen keinen wie auch immer gearteten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einem kardiovaskulären Krankheitsgeschehen feststellen konnten (21;67;68;157). Ähnlich widersprüchliche Studienergebnisse finden sich auch für andere eNOS-Polymorphismen (179).

Ein C101A-Polymorphismus ist bislang nicht beschrieben worden. In Anbetracht der Folgen dieses Nukleotidaustauschs auf die Proteinfunktion wäre es jedoch sehr wahrscheinlich, dass ein solcher Polymorphismus signifikante Auswirkungen auf die Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen haben könnte. Um dies in-vivo untersuchen zu können, bietet es sich an, die C101A-eNOS-Mutante im Rahmen eines transgenen Tiermodells zu untersuchen. Um das zu ermöglichen, wurde ebenfalls in dieser Arbeit ein Promotorkonstrukt hergestellt, mit welchem eine endothelspezifische Überexpression der C101A-eNOS-Mutante ermöglicht wird (siehe Abschnitt 4.5). Bei erfolgreicher Überexpression werden diese Tiere während ihrer Entwicklung und Lebensspanne einem erhöhten oxidativen Stress im Gefäßendothel ausgesetzt sein. Es kann erwartet werden, dass solche Untersuchungen dazu beitragen, eine ursächliche Beteiligung endothelialer reaktiver Sauerstoffverbindungen an Krankheitsprozessen im Blutgefäßsystem von Säugern nachzuweisen. Darüber hinaus lässt sich prüfen, ob diese Tiere einen Phänotyp entwickeln, der typischen kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie oder koronarer Herzkrankheit nahekommt. Schließlich ließen sich mit diesem Modell auch wertvolle Informationen zum Effekt potentiell vasoprotektiv wirksamer neuer Arzneistoffe gewinnen (z.B. direkte, NO-unabhängige Guanylatzyklase-Aktivatoren).

Abschließend werfen die hier vorgestellten Untersuchungen auch ein neues Licht auf die therapeutische Gabe von BH<sub>4</sub> bei endothelialer Dysfunktion. Beim Menschen wird an isolierten Gefäßen und in vivo eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch BH<sub>4</sub>-Gabe beobachtet (167;171). Obwohl diese Daten auf eine Verminderung der vaskulären BH<sub>4</sub>-Konzentration bei Atherosklerose hindeuten, zeigen Untersuchungen an cholesterolgefütterten Kaninchen und ApoE-knock-out-Mäusen genau das Gegenteil, nämlich eine erhöhte vaskuläre BH<sub>4</sub>-Konzentration (69).

Daher können die in verschiedenen Studien nachgewiesenen positiven Effekte von BH<sub>4</sub> auf die Endothelfunktion bei Atherosklerose (98;167;171;177) wahrscheinlich nicht bzw. nur bedingt auf einen einfachen Substitutionseffekt im Sinne der Regeneration einer entkoppelten eNOS zurückgeführt werden. Auch ein direkter antioxidativer Effekt durch Reaktion von BH<sub>4</sub> mit Superoxid ist nur wenig wahrscheinlich (176). Es muss nach den hier vorliegenden Daten vielmehr davon ausgegangen werden, dass die Entkopplung der eNOS eine Folge der Zerstörung des tetrahedralen Cystein-Zink-Komplexes ist. Dies stimmt mit mit kürzlich

publizierten Daten zur Entkopplung der eNOS durch Peroxynitrit überein (141;191). Dennoch wäre denkbar, dass die endotheliale Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen auf einer Entkopplung der eNOS beruht, die sich auf der Grundlage eines BH<sub>4</sub>-Mangels entwickelt. Schließlich ist bislang nicht bekannt, ob das tierexperimentell festgestellte Fehlen eines BH<sub>4</sub>-Mangels bei Atherosklerose auf die Situation beim Menschen übertragen werden kann.

## **6.5 Die Etablierung eines transgenen Tiermodells mit endothelspezifischer Überexpression der eNOS**

Um eine zellspezifische Überexpression in einem transgenen Tiermodell verwirklichen zu können, ist ein spezifisches genetisches Steuerinstrument (Promotor) erforderlich. Solche Promotoren sollten idealerweise nur in der Zielzelle zu einer Überexpression des entsprechenden Proteins führen. Den eNOS-Promotor selbst konnte man nicht verwenden, denn es würde zur Überexpression der eNOS in allen Zellen kommen, die auch physiologischerweise die eNOS exprimieren. Hierzu zählen neben den vaskulären Endothelzellen auch verschiedene Neurone im zentralen Nervensystem (122).

Es war also notwendig einen Promotor zu verwenden, der ausschließlich in Endothelzellen zu einer Überexpression des eingeschleusten Transgens führt. Zur Zeit der Planung dieses Projektes waren sechs Promotoren zur endothelspezifischen Expression bekannt. Der KDR/flk-1 und der von Willebrandfaktor-Promotor sind zwar *in vitro* aktiv, ihre spezifische Expression *in vivo* war allerdings strittig (38;134). Umgekehrt konnte beim Tie-1-Promotor *in vivo* eine endothelspezifische Expression gezeigt werden und nicht *in vitro* (84). Mit dem Preproendothelin-1-Promotor war bereits ein eNOS-Überexpressionsmodell der Maus etabliert worden (127). Bei diesem Modell ist die Interpretation der Ergebnisse im Fall der Atherosklerose oder Hypertonie allerdings schwierig, denn Angiotensin II kann in der Gefäßwand glatter Muskelzellen eine Expression von Endothelin-1 durch Aktivierung des Preproendothelin-1-Promotors auslösen (140;168;168). Es könnte demnach bei solchen atherosklerotischen oder hypertensiven transgenen Tieren zu einer durch Angiotensin II-induzierten eNOS-Expression in glatten Muskelzellen kommen, die bei Wildtyp-Mäusen

nicht vorkommt. Für die Beurteilung der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion war der Preproendothelin-1-Promotor demnach nicht geeignet.

Der ICAM-2-Promotor wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als endothelspezifisch aktiv beschrieben (27). Es gibt aber auch Kritik an seiner Expression (127). Außerdem ist der ICAM-2 ein humaner Promotor, so dass bei der Expression von Genen in Mäusen nicht kalkulierbare speziesbedingte Probleme auftreten könnten.

Für die geplanten Untersuchung zur Pathogenese der endothelialen Dysfunktion *in vivo* wurde deshalb der Tie-2-Promotor verwendet. Eine transgene Mauslinie mit Endothelzell-spezifischer Überexpression der eNOS unter Verwendung des Tie-2-Promotors ist noch nicht beschrieben. Die Vorteile des Tie-2-Promotors sind seine hohe Spezifität für eine endotheliale Expression (151;154) und der murine Ursprung des Promotors, der keine speziesbedingten Schwierigkeiten machen dürfte. Durch das Hinzufügen der Tie-2-Enhancers zum Promotor konnte erreicht werden, dass die Überexpression des Transgens auch noch bei erwachsenen Tieren erfolgte (154).

Nach der Mikroinjektion der eNOS in befruchtete Eizellen, wurden diese in weibliche Mäuse implantiert. Die geborenen Tiere wurden mit der etablierten Genotypisierungs-PCR auf das Vorkommen des Transgens hin untersucht. Die durchgeführte PCR zur Genotypisierung der Founder-Tiere zeigt deutlich, welche Mäuse das Transgen tragen. Sie sagt allerdings noch nicht aus, ob die injizierte cDNA auch in das Genom der Foundertiere aufgenommen wurde. Diese Frage lässt sich erst in der folgenden, der F<sub>1</sub>-Generation, beantworten. Die Genotypisierung gibt außerdem keine Auskunft über das Ausmaß der Expression des Transgens. Zur genauen Charakterisierung der Tiere sind noch weitere Versuche geplant. Die Tiere werden derzeit auf den einheitlichen genetischen Hintergrund des C57black6-Stammes zurückgekreuzt.

In dieser Arbeit wurden erstmals wesentliche Details des Mechanismus der endothelialen Dysfunktion beschrieben. Bei den Untersuchungen der radikalinduzierten Störungen des NO<sup>\*</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges zeigte sich, dass zwei der drei wichtigsten Proteine, die eNOS und die sGC, bei endothelialer Dysfunktion nachhaltig geschädigt sind. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die sGC durch oxidativen Stress derart in ihrer Funktion gestört wird, dass die physiologisch erforderliche Aktivität des Enzyms selbst durch eine ausgeprägte

kompensatorische Heraufregulation der Expression nicht mehr gewährleisten ist. Die Schädigung der eNOS äußert sich in einer Entkopplung, so dass das sonst protektiv wirkende Enzym selbst Quelle reaktiver Sauerstoffverbindung werden kann. Schließlich wurde mit der C101A-eNOS-Mutante ein mögliches wissenschaftliches Modell der eNOS-Entkopplung entwickelt, mit dem sich die Möglichkeit ergibt, die Auswirkungen von oxidativem Stress im Endothel auf vaskuläre Funktionen in-vivo zu untersuchen.

## **7 ZUSAMMENFASSUNG**

---

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung von Störungen des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges bei endothelialer Dysfunktion. Da bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen eine endotheliale Dysfunktion vorliegt, wurde der schädigende Einfluss von reaktiven Sauerstoffverbindungen auf die beiden wichtigsten Komponenten der NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktion, die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die lösliche Guanylatzyklase (sGC) studiert.

Ausgehend von ersten Befunden zur Schädigung des NO<sup>•</sup>/cGMP-Weges bei experimenteller Hypertonie, wurden Veränderungen der Expression und Aktivität der sGC bei diesem Krankheitsbild näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Erkrankung, die mit einer Steigerung der vaskulären Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen assoziiert ist, zu einer Halbierung der sGC-Expression und Aktivität führt. Weitere Untersuchungen sollten den Einfluss spezifischer reaktiver Sauerstoffverbindungen aufklären. So zeigte extrazelluläres Superoxid keinen Effekt, während Peroxynitrit zwar die Aktivität der sGC reduzierte, aber die Expression nicht beeinflusste. Im Gegensatz dazu führte eine vermehrte intrazelluläre Superoxidbildung zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust der sGC, die mit einem kompensatorischen Anstieg der Expression verbunden war. Die gleiche Situation wurde auch bei experimenteller Atherosklerose gefunden. Damit konnten die eher unter artefiziellen Laborbedingungen erhobenen Befunde auf eine pathologische Situation übertragen werden. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass vaskulärer oxidativer Stress bei der Pathophysiologie der Hypertonie und Atherosklerose unterschiedliche Auswirkungen hat. Während bei der Hypertonie die sGC-Aktivität und Expression geschädigt ist, kommt es bei Atherosklerose zu einer kompensatorischen Hochregulation der sGC-Expression im Sinne einer Erhaltung der Effizienz des NO<sup>•</sup>/cGMP-Weges. Diese Erkenntnisse lassen neue pharmakotherapeutische Maßnahmen, die den vaskulären NO<sup>•</sup>/cGMP-Weg ansteuern, bei koronarer Herzkrankheit eher sinnvoll erscheinen als bei der Hypertonie.

Die hier untersuchte zweite Komponente des NO<sup>•</sup>/cGMP-Signaltransduktionsweges ist die eNOS. Ausgehend von einigen Berichten, dass bei einem Mangel des Kofaktors BH<sub>4</sub> die eNOS entkoppelt und Superoxidradikale bildet, wurde eine eNOS-Mutante mit veränderter BH<sub>4</sub>-Affinität etabliert. Verglichen mit der Wildtyp-eNOS zeigte diese Mutante, bei der die Aminosäure Cystein 101 durch Alanin ersetzt wurde, eine geringere katalytische Aktivität, eine verminderte NO<sup>•</sup>-Bildung sowie eine erhöhte Superoxidproduktionsrate. Nach Erstellung

einer stabil transfizierten Linie von humanen embryonalen Nierenzellen ließ sich in diesen Zellen eine deutliche Steigerung oxidativ modifizierter Proteine beobachten. Bei der C101A-eNOS-Mutante wurde die Zinkbindung verändert und dadurch die Dimerisierung des Enzyms selbst in Gegenwart von  $\text{BH}_4$  entscheidend gestört. Insgesamt konnte somit belegt werden, dass die eNOS selbst eine Quelle für oxidativen Stress sein kann, wenn es durch eine Mutation zu einer ungenügenden Bindung von  $\text{BH}_4$  kommt. Beim Menschen könnte eine solche Mutation die Folge eines Polymorphismus oder einer oxidativen Veränderung der Cystein 101-Region sein.

Um die Folgen der eNOS-Entkopplung in vivo studieren zu können, sollte ein transgenes Mausmodell geschaffen werden, welches das defekte Enzym endothelspezifisch überexprimiert. Daher wurde im abschließenden Teil dieser Arbeit ein Promotorkonstrukt entwickelt, mit welchem ein Mausmodell für die endothelspezifische Überexpression der Wildtyp-eNOS und der eNOS-Mutante etabliert werden kann. Die Effektivität des Konstruktes wurde am Beispiel der Wildtyp-eNOS getestet. Von insgesamt 13 Founder-Tieren wiesen 6 das Transgen auf. Sie werden derzeit zurückgekreuzt. Eine Charakterisierung der Tiere und damit eine Beurteilung der Effektivität der endothelspezifischen eNOS-Überexpression ist an diesem Tiermodell möglich.

Zusammengefasst konnten in der vorliegen Arbeit erstmals wesentliche Details des Mechanismus der endothelialen Dysfunktion aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass zwei der drei wichtigsten Proteine des  $\text{NO}^*/\text{cGMP}$ -Weges, die eNOS und die sGC, bei endothelialer Dysfunktion nachhaltig geschädigt sind. Während die eNOS entkoppeln und selbst Quelle von vaskulärem oxidativen Stress werden kann, wird die sGC durch oxidativen Stress derart in ihrer Funktion gestört, dass selbst eine ausgeprägte kompensatorische Heraufregulation der Expression die physiologisch erforderliche Aktivität des Enzyms nicht mehr gewährleisten kann. Schließlich wurde mit der C101A-eNOS-Mutante ein wertvolles wissenschaftliches Werkzeug bereitgestellt, mit welchem sich erstmals die Möglichkeit ergibt, die Auswirkungen von isolierten oxidativen Stress im Endothel auf vaskuläre Funktionen in-vivo zu untersuchen.

## **8 LITERATURVERZEICHNIS**

---

1. Abu-Soud, H. M., J. Wang, D. L. Rousseau, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, and D. J. Stuehr. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J.Biol.Chem.* 270: 22997-23006, 1995.
2. Andreopoulos, S. and A. Papapetropoulos. Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation [In Process Citation]. *Gen.Pharmacol.* 34: 147-157, 2000.
3. Awolesi, M. A., W. C. Sessa, and B. E. Sumpio. Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 96: 1449-1454, 1995.
4. Babior, B. M. and R. C. Woodman. Chronic granulomatous disease. *Semin.Hematol.* 27: 247-259, 1990.
5. Balla, G., H. S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J. W. Eaton, and G. M. Vercellotti. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J.Biol.Chem.* 267: 18148-18153, 1992.
6. Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 1620-1624, 1990.
7. Beckman, J. S. and W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am.J.Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
8. Beltowski, J. Guanylin and related peptides. *J Physiol Pharmacol.* 52: 351-375, 2001.
9. Bolotina, V. M., S. Najibi, J. J. Palacino, P. J. Pagano, and R. A. Cohen. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.
10. Bonini, M. G. and O. Augusto. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J.Biol.Chem.* 276: 9749-9754, 2001.
11. Bonini, M. G., R. Radi, G. Ferrer-Sueta, A. M. Ferreira, and O. Augusto. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J.Biol.Chem.* 274: 10802-10806, 1999.
12. Bouloumie, A., V. B. Schini-Kerth, and R. Busse. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 41: 773-780, 1999.
13. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254, 1976.
14. Bredt, D. S., P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, and S. H. Snyder. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718, 1991.
15. Bredt, D. S. and S. H. Snyder. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86: 9030-9033, 1989.
16. Bredt, D. S. and S. H. Snyder. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 682-685, 1990.
17. Brüne, B., K.-U. Schmidt, and V. Ullrich. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur.J.Biochem.* 192: 683-688, 1990.
18. Buga, G. M., J. M. Griscavage, N. E. Rogers, and L. J. Ignarro. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ.Res.* 73: 808-812, 1993.

19. Busse, R. and I. Fleming. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J.Vasc.Res.* 33: 181-194, 1996.
20. Cai, H. and D. G. Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* 87: 840-844, 2000.
21. Cai, H., D. E. Wilcken, and X. L. Wang. The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol.Med.* 77: 511-514, 1999.
22. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59: 527-605, 1979.
23. Chen, P. F., A. L. Tsai, and K. K. Wu. Cysteine 99 of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) is critical for tetrahydrobiopterin-dependent NOS-III stability and activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 215: 1119-1129, 1995.
24. Cohen, R. A., R. M. Weisbrod, M. Gericke, M. Yaghoubi, C. Bierl, and V. M. Bolotina. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation - Refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase and inhibition of store-operated  $Ca^{2+}$  influx. *Circ.Res.* 84: 210-219, 1999.
25. Cornwell, T. L., K. B. Pryzwansky, T. A. Wyatt, and T. M. Lincoln. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* 40: 923-931, 1991.
26. Cosentino, F. and Z. S. Katusic. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 91: 139-144, 1995.
27. Cowan, P. J., D. Tsang, C. M. Pedic, L. R. Abbott, T. A. Shinkel, A. J. d'Apice, and M. J. Pearse. The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J.Biol.Chem.* 273: 11737-11744, 1998.
28. Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric.Oxide.* 1: 145-157, 1997.
29. Cudd, A. and I. Fridovich. Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J.Biol.Chem.* 257: 11443-11447, 1982.
30. Daley, S. J., E. E. Herderick, J. F. Cornhill, and K. A. Rogers. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis: Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler.Thromb.* 14: 95-104, 1994.
31. Daley, S. J., K. F. Klemp, J. R. Guyton, and K. A. Rogers. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis: Part 2: Differing morphological severity of atherogenesis despite matched plasma cholesterol levels. *Arterioscler.Thromb.* 14: 105-114, 1994.
32. Davies, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol.Chem.* 262: 9895-9901, 1987.
33. Davies, K. J., M. E. Delsignore, and S. W. Lin. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol.Chem.* 262: 9902-9907, 1987.
34. Denicola, A., J. M Souza, and R. Radi. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95: 3566-3571, 1998.
35. Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. M. Zeiher. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.

36. Drummond, G. R., H. Cai, M. E. Davis, S. Ramasamy, and D. G. Harrison. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ.Res.* 86: 347-354, 2000.
37. Fan, B., G. Gupta, R. S. Danziger, J. M. Friedman, and D. L. Rousseau. Resonance Raman characterization of soluble guanylate cyclase expressed from baculovirus. *Biochemistry* 37: 1178-1184, 1998.
38. Ferreira, V., Z. Assouline, J. L. Schwachtgen, B. R. Bahnak, D. Meyer, and D. Kerbiriou-Nabias. The role of the 5'-flanking region in the cell-specific transcription of the human von Willebrand factor gene. *Biochem.J.* 293: 641-648, 1993.
39. Field, L., R. V. Dilts, R. Ravichandran, G. Lenhart, and G. E. Carnahan. An unusual stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; x-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethyl thionitrite. *JCS Chem. Commun.* 1157: 249-250, 1978.
40. Filippov, G., D. B. Bloch, and K. D. Bloch. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.* 100: 942-948, 1997.
41. Foster, D. C., B. J. Wedel, S. W. Robinson, and D. L. Garbers. Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 135:1-39.: 1-39, 1999.
42. Freiman, P. C., G. G. Mitchell, D. D. Heistad, M. L. Armstrong, and D. G. Harrison. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ.Res.* 58: 783-789, 1986.
43. Friebe, A. and D. Koesling. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol.Pharmacol.* 53: 123-127, 1998.
44. Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos, and W. C. Sessa. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601, 1999.
45. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
46. Garbers, D. L. The guanylyl cyclase receptors. *Methods* 19: 477-484, 1999.
47. Garbers, D. L., D. Koesling, and G. Schultz. Guanylyl cyclase receptors. *Mol.Biol.Cell* 5: 1-5, 1994.
48. Garcia-Cardena, G., R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, and W. C. Sessa. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824, 1998.
49. Goldstein, S. and G. Czapski. The reaction of NO<sup>·</sup> with O<sub>2</sub><sup>·-</sup> and HO<sub>2</sub><sup>·</sup>: A pulse radiolysis study. *Free Radic.Biol.Med.* 19: 505-510, 1995.
50. Golino, P., F. Piscione, J. T. Willerson, M. Capelli-Bigazzi, A. Focaccio, B. Villari, C. Indolfi, E. Russolillo, M. Condorelli, and M. Chiariello. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N.Engl.J.Med.* 324: 641-648, 1991.
51. Griendling, K. K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* 86: 494-501, 2000.

52. Grunfeld, S., C. A. Hamilton, S. Mesaros, S. W. McClain, A. F. Dominiczak, D. F. Bohr, and T. Malinski. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 26: 854-857, 1995.
53. Gupta, G., M. Azam, L. Yang, and R. S. Danziger. The b2 subunit inhibits stimulation of the a1/b1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide - Potential relevance to regulation of blood pressure. *J.Clin.Invest.* 100: 1488-1492, 1997.
54. Hacker, A., E. Noack, and G. Kojda. Continuous treatment with pentaerythritol tetranitrate prevents the increase of LDL-oxidation in established atherosclerosis. In Navaro-López F, ed. XXI Congress of the European Society of Cardiology. Bologna, Italia, Monduzzi Editore. 1999, 251-257.
55. Harrison, D. G. Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction. *J.Clin.Invest.* 100(9): 2153-2157, 1997.
56. Harteneck, C., D. Koesling, A. Soling, G. Schultz, and E. Bohme. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 272: 221-223, 1990.
57. Heinzl, B., M. John, P. Klatt, E. Böhme, and B. Mayer.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem.J.* 281: 627-630, 1992.
58. Hingorani, A. D., C. F. Liang, J. Fatibene, A. Lyon, S. Monteith, A. Parsons, S. Haydock, R. V. Hopper, N. G. Stephens, K. M. O'Shaughnessy, and M. J. Brown. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu<sup>298</sup>-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100: 1515-1520, 1999.
59. Hirata, K., R. Kuroda, T. Sakoda, M. Katayama, N. Inoue, M. Suematsu, S. Kawashima, and M. Yokoyama. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension* 25: 180-185, 1995.
60. Hoenicka, M., E. M. Becker, H. Apeler, T. Sirichoke, H. Schroder, R. Gerzer, and J. P. Stasch. Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J.Mol.Med.* 77: 14-23, 1999.
61. Humbert, P., F. Niroomand, G. Fischer, B. Mayer, D. Koesling, K. D. Hinsch, H. Gausepohl, R. Frank, G. Schultz, and E. Bohme. Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur.J.Biochem.* 190: 273-278, 1990.
62. Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 9265-9269, 1987.
63. Ignarro, L. J., K. S. Wood, and M. S. Wolin. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79: 2870-2873, 1982.
64. Inoue, N., R. C. Venema, H. Sayegh, Y. Ohara, T. Murphy, and D. G. Harrison. Molecular regulation of the endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor b-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15: 1255-1261, 1995.
65. Ischiropoulos, H., L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. D. Smith, and J. S. Beckman. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch.Biochem.Biophys.* 298: 431-437, 1992.
66. Jayakody, T. L., M. P. J. Senaratne, A. B. R. Thompson, and C. T. Kappagoda. Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 63: 1206-1209, 1985.

67. Karvonen, J., H. Kauma, K. Kervinen, M. Rantala, M. Ikäheimo, M. Päivänsalo, M. J. Savolainen, and Y. A. Kesäniemi. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J.Intern.Med.* 251: 102-110, 2002.
68. Kato, N., T. Sugiyama, H. Morita, T. Nabika, H. Kurihara, Y. Yamori, and Y. Yazaki. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 33: 933-936, 1999.
69. Katusic, Z. S. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 281: H981-H986, 2001.
70. Khairutdinov, R. F., J. W. Coddington, and J. K. Hurst. Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* 39: 14238-14249, 2000.
71. Kissner, R., T. Nauser, P. Bugnon, P. G. Lye, and W. H. Koppenol. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem.Res.Toxicol.* 10: 1285-1292, 1997.
72. Klatt, P., K. Schmidt, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bachinger, and B. Mayer. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J* 14: 3687-3695, 1995.
73. Kleschyov, A. L., H. Mollnau, M. Oelze, T. Meinertz, Y. Huang, D. G. Harrison, and T. Munzel. Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 275: 672-677, 2000.
74. Kloss, S., A. Bouloumie, and A. Mulsch. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35: 43-47, 2000.
75. Ko, F.-N., C.-C. Wu, S.-C. Kuo, F.-Y. Lee, and C.-M. Teng. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84: 4226-4233, 1994.
76. Koesling, D. Modulators of soluble guanylyl cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358: 123-126, 1998.
77. Koesling, D. and A. Friebe. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 135:41-65.: 41-65, 1999.
78. Kojda, G., Hacker, A., and Noack, E. Low dose nonintermittend pentaerythritol tetranitrate preserves endothelial function in established atherosclerosis. *Circulation* 98(Suppl1), I-311. 1998. Ref Type: Abstract
79. Kojda, G. and D. G. Harrison. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc.Res.* 43: 562-571, 1999.
80. Kojda, G., K. Kottenberg, A. Hacker, and E. Noack. Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. *Pharm.Acta Helv.* 73: 27-35, 1998.
81. Kojda, G., D. Stein, E. Kottenberg, E. M. Schnaith, and E. Noack. In vivo effects of pentaerythritol-tetranitrate and isosorbide- 5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 25: 763-773, 1995.

82. Koppenol, W. H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.* 25: 385-391, 1998.
83. Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman. Peroxyxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.* 5: 834-842, 1992.
84. Korhonen, J., I. Lahtinen, M. Halmekyto, L. Alhonen, J. Janne, D. Dumont, and K. Alitalo. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* 86: 1828-1835, 1995.
85. Kroll, J. and J. Waltenberger. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 252: 743-746, 1998.
86. Kubes, P., M. Suzuki, and D. N. Granger. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 4651-4655, 1991.
87. Kumagai, Y., K. Midorikawa, Y. Nakai, T. Yoshikawa, K. Kushida, S. Homma-Takeda, and N. Shimojo. Inhibition of nitric oxide formation and superoxide generation during reduction of LY83583 by neuronal nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 360: 213-218, 1998.
88. Laber, U., T. Kober, V. Schmitz, A. Schrammel, W. Meyer, B. Mayer, M. Weber, and G. Kojda. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 105: 855-860, 2002.
89. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
90. Laufs, U., V. La Fata, J. Plutzky, and J. K. Liao. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135, 1998.
91. Laursen, J. B., M. Somers, S. Kurz, L. McCann, A. Warnholtz, B. A. Freeman, M. Tarpey, T. Fukai, and D. G. Harrison. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxyxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103: 1282-1288, 2001.
92. Lembo, G., N. De Luca, C. Battagli, G. Iovino, A. Aretini, M. Musicco, G. Frati, F. Pompeo, C. Vecchione, and B. Trimarco. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke* 32: 735-740, 2001.
93. Liu, H., T. Force, and K. D. Bloch. Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 272: 6038-6043, 1997.
94. Liu, J., G. Garcia-Cardena, and W. C. Sessa. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34: 12333-12340, 1995.
95. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275, 1951.
96. Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, T. L. Shook, R. R. Wayne, G. H. Mudge, R. W. Alexander, and P. Ganz. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* 315: 1046-1051, 1986.
97. Lyman, S. V. and J. K. Hurst. Rapid reaction between peroxyxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J.Am.Chem.Soc.* 117: 8867-8868, 1995.

98. Maier, W., F. Cosentino, R. B. Lutolf, M. Fleisch, C. Seiler, O. M. Hess, B. Meier, and T. F. Luscher. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 35: 173-178, 2000.
99. Malinski, T. and Z. Taha. Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358: 676-678, 1992.
100. Marletta, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J.Biol.Chem.* 268: 12231-12234, 1993.
101. Martasek, P., R. T. Miller, Q. Liu, L. J. Roman, J. C. Salerno, C. T. Migita, C. S. Raman, S. S. Gross, M. Ikeda-Saito, and B. S. Masters. The C331A mutant of neuronal nitric-oxide synthase is defective in arginine binding. *J Biol.Chem.* 273: 34799-34805, 1998.
102. Matsubara, M., K. Titani, and H. Taniguchi. Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: regulation by protein phosphorylation and Ca(2+)-calmodulin. *Biochemistry* 35: 14651-14658, 1996.
103. Mayer, B., P. Klatt, B. M. List, C. Harteneck, and K. Schmidt. Large-scale purification of rat brain nitric oxide synthase from baculovirus overexpression system. *Methods Enzymol.* 268:420-7.: 420-427, 1996.
104. Mayer, B. and E. R. Werner. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 351: 453-463, 1995.
105. Mayhan, W. G., F. M. Faraci, and D. D. Heistad. Impairment of endothelium-dependent responses of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Am.J.Physiol.* 253: H1435-H1440, 1987.
106. McIntyre, M., D. F. Bohr, and A. F. Dominiczak. Endothelial function hypertension - The role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-545, 1999.
107. McQuillan, L. P., G. K. Leung, P. A. Marsden, S. K. Kostyk, and S. Kourembanas. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms [published erratum appears in *Am.J.Physiol.* 1995 268 (2 pt 2):section H following table of contents]. *Am.J.Physiol.* 267: H1921-H1927, 1994.
108. Mittal, C. K. and F. Murad. Guanylate cyclase: Regulation of cyclic GMP metabolism. In Nathanson, J. A. and J. W. Kebackian, eds. *Cyclic Nucleotides I*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. 1982, 225-260.
109. Miyamoto, Y., Y. Saito, N. Kajiyama, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, M. Nakayama, S. Kamitani, M. Harada, M. Ishikawa, K. Kuwahara, E. Ogawa, I. Hamanaka, N. Takahashi, T. Kaneshige, H. Teraoka, T. Akamizu, N. Azuma, Y. Yoshimasa, T. Yoshimasa, H. Itoh, I. Masuda, H. Yasue, and K. Nakao. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3-8, 1998.
110. Moncada, S. and A. Higgs. Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* 329: 2002-2012, 1993.
111. Moncada, S., D. D. Rees, R. Schulz, and R. M. J. Palmer. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 2166-2170, 1991.
112. Morawietz, H., M. Weber, U. Rueckschloss, N. Lauer, A. Hacker, and G. Kojda. Upregulation of Vascular NAD(P)H Oxidase Subunit gp91phox and Impairment of the Nitric Oxide Signal Transduction Pathway in Hypertension. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 285: 1130-1135, 2001.

- 
113. Moroi, M., L. Zhang, T. Yasuda, R. Virmani, H. K. Gold, M. C. Fishman, and P. L. Huang. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J.Clin.Invest.* 101: 1225-1232, 1998.
114. Murad, F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 276: 1189-1192, 1996.
115. Murphy, T. H., A. P. So, and S. R. Vincent. Histochemical detection of quinone reductase activity in situ using LY 83583 reduction and oxidation. *J Neurochem.* 70: 2156-2164, 1998.
116. Mülsch, A., J. Bauersachs, A. Schäfer, J. P. Stasch, R. Kast, and R. Busse. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br.J.Pharmacol.* 120: 681-689, 1997.
117. Mülsch, A., A. Lückhoff, R. Busse, and E. Bassenge. LY 83583 (6-anilino-5,8-quinolinedione) blocks nitrovasodilator induced cyclic GMP increases and inhibition of platelet activation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 340: 119-125, 1989.
118. Mülsch, A., M. Oelze, S. Klöss, H. Mollnau, A. Töpfer, A. Smolenski, U. Walter, J. P. Stasch, A. Warnholtz, U. Hink, T. Meinertz, and T. Münzel. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 103: 2188-2194, 2001.
119. Mülsch, A., Weber, M., Klös, S., Behrens, M., Lauer, N., and Kojda, G. Impairment of soluble guanylyl cyclase by peroxynitrite. *Circulation* 102(18):II-, 351. 2000.  
Ref Type: Abstract
120. Münzel, T. and D. G. Harrison. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J.Mol.Med.* 75: 891-900, 1997.
121. Naruse, K., K. Shimizu, M. Muramatsu, Y. Toki, Y. Miyazaki, K. Okumura, H. Hashimoto, and T. Ito. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta: PGH<sub>2</sub> does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler.Thromb.* 14: 746-752, 1994.
122. Nathan, C. and Q. Xie. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994.
123. Nathan, C. and Q. Xie. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 269: 13725-13728, 1994.
124. Neville, D. M., Jr. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J.Biol.Chem.* 246: 6328-6334, 1971.
125. Nishida, K., D. G. Harrison, J. P. Navas, A. Fisher, S. P. Dockery, M. Uematsu, R. M. Nerem, R. W. Alexander, and T. J. Murphy. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest.* 90: 2092-2096, 1992.
126. Ohara, Y., H. S. Sayegh, J. J. Yamin, and D. G. Harrison. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension* 25: 415-420, 1995.
127. Ohashi, Y., S. Kawashima, K. Hirata, T. Yamashita, T. Ishida, N. Inoue, T. Sakoda, H. Kurihara, Y. Yazaki, and M. Yokoyama. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase [see comments]. *J.Clin.Invest.* 102: 2061-2071, 1998.

128. Ohlstein, E. H., K. S. Wood, and L. J. Ignarro. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch.Biochem.Biophys.* 218: 187-198, 1982.
129. Pagano, P. J., J. K. Clark, M. E. Cifuentes-Pagano, S. M. Clark, G. M. Callis, and M. T. Quinn. Localization of a constitutively active, phagocyte-like, NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 14438-14488, 1997.
130. Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige, and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
131. Panza, J. A., A. A. Quyyumi, J. E. Brush, Jr., and S. E. Epstein. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N.Engl.J.Med.* 323: 22-27, 1990.
132. Papapetropoulos, A., G. Abou-Mohamed, N. Marczin, F. Murad, R. W. Caldwell, and J. D. Catravas. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1b. *Br.J.Pharmacol.* 118: 1359-1366, 1996.
133. Papapetropoulos, A., N. Marczin, G. Mora, A. Milici, F. Murad, and J. D. Catravas. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension* 26: 696-704, 1995.
134. Patterson, C., M. A. Perrella, C. M. Hsieh, M. Yoshizumi, M. E. Lee, and E. Haber. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* 270: 23111-23118, 1995.
135. Pfeiffer, S., B. Mayer, and B. Hemmens. Nitric Oxide: Chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew.Chem.Int.Ed.* 38: 1714-1731, 1999.
136. Pfeiffer, S., K. Schmidt, and B. Mayer. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite - Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide *in vivo*. *J.Biol.Chem.* 275: 6346-6352, 2000.
137. Pou, S., W. S. Pou, D. S. Bredt, S. H. Snyder, and G. M. Rosen. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 267: 24173-24176, 1992.
138. Pritchard, K. A., Jr., L. Groszek, D. M. Smalley, W. C. Sessa, M. D. Wu, P. Villalon, M. S. Wolin, and M. B. Stemerman. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ.Res.* 77: 510-518, 1995.
139. Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch.Biochem.Biophys.* 288: 481-487, 1991.
140. Rajagopalan, S., J. B. Laursen, A. Borthayre, S. Kurz, J. Keiser, S. Haleen, A. Giaid, and D. G. Harrison. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30: 29-34, 1997.
141. Raman, C. S., H. Li, P. Martasek, V. Kral, B. S. Masters, and T. L. Poulos. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95: 939-950, 1998.
142. Rao, G. H., S. Krishnamurthi, L. Rajj, and J. G. White. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem.Med.Metab.Biol.* 43: 271-275, 1990.
143. Ravichandran, L. V. and R. A. Jones. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *FEBS Lett.* 374: 295-298, 1995.

144. Recalcati, S., D. Taramelli, D. Conte, and G. Cairo. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. *Blood* 91: 1059-1066, 1998.
145. Rizzo, V., A. Sung, P. Oh, and J. E. Schnitzer. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J.Biol.Chem.* 273: 26323-26329, 1998.
146. Romero, N., A. Denicola, J. M. Souza, and R. Radi. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch.Biochem.Biophys.* 368: 23-30, 1999.
147. Ross, R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 340: 115-126, 1999.
148. Ruetten, H., U. Zabel, W. Linz, and H. H. H. W. Schmidt. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.* 85: 534-541, 1999.
149. Russwurm, M. and D. Koesling. Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol.Cell.Biochem.* 230: 159-164, 2002.
150. Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986.
151. Sato, T. N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, and Y. Qin. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376: 70-74, 1995.
152. Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth, and F. Hofmann. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation [In Process Citation]. *Circ.Res.* 87: 825-830, 2000.
153. Schlaeger, T. M., S. Bartunkova, J. A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch, and T. N. Sato. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 3058-3063, 1997.
154. Schlaeger, T. M., S. Bartunkova, J. A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch, and T. N. Sato. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 3058-3063, 1997.
155. Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404: 197-201, 2000.
156. Schmidt, K., W. F. Graier, G. M. Kostner, B. Mayer, and W. R. Kukovetz. Activation of soluble guanylate cyclase by nitrovasodilators is inhibited by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 172: 614-619, 1990.
157. Schneider, M. P., J. Erdmann, C. Delles, E. Fleck, V. Regitz-Zagrosek, and R. E. Schmieder. Functional gene testing of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase. *J Hypertens.* 18: 1767-1773, 2000.
158. Schultz, G. and E. Böhme. Guanylate Cyclase. In Bergmeyer, H. U., ed. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim, FRG, Verlag Chemie. 1984, 379-389.
159. Schulz, S., P. S. T. Yuen, and D. L. Garbers. The expanding family of guanylyl cyclases. *TIPS* 12: 116-120, 1991.

- 
160. Scott-Burden, T. and P. M. Vanhoutte. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 87 Suppl. 5: V51-V55, 1993.
161. Scott, W. S. and D. K. Nakayama. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *J.Surg.Res.* 80: 309-314, 1998.
162. Shimouchi, A., S. P. Janssens, D. B. Bloch, W. M. Zapol, and K. D. Bloch. cAMP regulates soluble guanylate cyclase b1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 265: L456-L461, 1993.
163. Simmerman, H. K. and L. R. Jones. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol.Rev.* 78: 921-947, 1998.
164. Sinnaeve, P., J. D. Chiche, Z. X. Nong, O. Varenne, N. Van Pelt, H. Gillijns, D. Collen, K. D. Bloch, and S. Janssens. Soluble guanylate cyclase  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  gene transfer increases NO responsiveness and reduces neointima formation after balloon injury in rats via antiproliferative and antimigratory effects. *Circ.Res.* 88: 103-109, 2001.
165. Stasch, J. P., E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, A. Feurer, R. Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiss, H. Schroder, W. Schroeder, E. Stahl, W. Steinke, A. Straub, and M. Schramm. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410: 212-215, 2001.
166. Stone, J. R. and M. A. Marletta. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33: 5636-5640, 1994.
167. Stroes, E., J. Kastelein, F. Cosentino, W. Erkelens, R. Wever, H. Koomans, T. Lüscher, and T. Rabelink. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J.Clin.Invest.* 99: 41-46, 1997.
168. Sung, C. P., A. J. Arleth, B. L. Storer, and E. H. Ohlstein. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 271: 429-437, 1994.
169. Tan, E., M. V. Gurjar, R. V. Sharma, and R. C. Bhalla. Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc.Res.* 43: 788-797, 1999.
170. Tesauro, M., W. C. Thompson, P. Rogliani, L. Qi, P. P. Chaudhary, and J. Moss. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97: 2832-2835, 2000.
171. Tiefenbacher, C. P., T. Bleeke, C. Vahl, K. Amann, A. Vogt, and W. Kubler. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 102: 2172-2179, 2000.
172. Uematsu, M., Y. Ohara, J. P. Navas, K. Nishida, T. J. Murphy, R. W. Alexander, R. M. Nerem, and D. G. Harrison. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 269: C1371-C1378, 1995.
173. Ujiie, K., J. G. Drewett, P. S. Yuen, and R. A. Star. Differential expression of mRNA for guanylyl cyclase-linked endothelium-derived relaxing factor receptor subunits in rat kidney. *J.Clin.Invest* 91: 730-734, 1993.

- 
174. Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo, and K. A. Pritchard, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95(16): 9220-9225, 1998.
175. Vasquez-Vivar, J., P. Martasek, J. Whitsett, J. Joseph, and B. Kalyanaraman. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem.J* 362: 733-739, 2002.
176. Vasquez-Vivar, J., J. Whitsett, P. Martasek, N. Hogg, and B. Kalyanaraman. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR-kinetic analysis and characterization of the pteridine radical. *Free Radic.Biol.Med.* 31: 975-985, 2001.
177. Verma, S., F. Lovren, A. S. Dumont, K. J. Mather, A. Maitland, T. M. Kieser, C. R. Triggle, and T. J. Anderson. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in human saphenous veins. *J Thorac.Cardiovasc.Surg.* 120: 668-671, 2000.
178. Wang, X. L., A. S. Sim, R. F. Badenhop, R. M. McCredie, and D. E. L. Wilcken. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature Med.* 2: 41-45, 1996.
179. Wattanapitayakul, S. K., M. J. Mihm, A. P. Young, and J. A. Bauer. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol.Sci.* 22: 361-368, 2001.
180. Weber, M., N. Lauer, A. Mulsch, and G. Kojda. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic.Biol.Med.* 31: 1360-1367, 2001.
181. Wedel, B., P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Böhme, G. Schultz, and D. Koesling. Mutation of His-105 in the b<sub>1</sub> subunit yields a nitric oxide- insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91: 2592-2596, 1994.
182. Wei, C., S. Jiang, J. A. Lust, R. C. Daly, and C. G. McGregor. Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin.Proc.* 71: 346-350, 1996.
183. Weitzman, S. A. and L. I. Gordon. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76: 655-663, 1990.
184. Wu, C. C., F. N. Ko, S. C. Kuo, F. Y. Lee, and C. M. Teng. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br.J.Pharmacol.* 116: 1973-1978, 1995.
185. Wu, K. K. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J.Formos.Med.Assoc.* 95: 661-666, 1996.
186. Xia, Y., A. L. Tsai, V. Berka, and J. L. Zweier. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase - A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J.Biol.Chem.* 273: 25804-25808, 1998.
187. Yoshimura, M., H. Yasue, M. Nakayama, Y. Shimasaki, H. Sumida, S. Sugiyama, K. Kugiyama, H. Ogawa, Y. Ogawa, Y. Saito, Y. Miyamoto, and K. Nakao. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum.Genet.* 103: 65-69, 1998.
188. Zeiher, A. M., H. Drexler, B. Saurbier, and H. Just. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J.Clin.Invest.* 92: 652-662, 1993.

189. Zembowicz, A., J. Tang, and K. K. Wu. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *J.Biol.Chem.* 270: 17006-17010, 1995.
190. Zhang, M. and H. J. Vogel. Characterization of the calmodulin-binding domain of rat cerebellar nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 269: 981-985, 1994.
191. Zou, M. H., C. Shi, and R. A. Cohen. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin.Invest* 109: 817-826, 2002.

## **9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS**

---

## Originalarbeiten

Weber M, Lauer N, Mülsch A, Kojda G (2001). The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1360-7

Morawietz H, Weber M, Rückschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G (2001). Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(5):1130-5.

Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammel A, Meyer W, Mayer B, Weber M, Kojda G (2002). Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation* 105(7):855-60

Kottenberg E, Weber M, Kojda G (2002). The effect of hypercholesterolemia on platelet soluble guanylyl cyclase. *Gen Pharmacol*, in press

## Reviews

Weber M, Harrison DG, Kojda G (2000). Nitric oxide (NO) and vascular oxidative stress. Importance in coronary disease, hypertension, diabetes mellitus and heart failure. *Med Monatsschr Pharm*, 23(1):12-17, (German)

## Abstracts

Lauer N, Weber M, Noack E, Kojda G (1999). Short-term exposure to superoxide radicals has no effect on the vascular signal transduction pathway of nitric oxide. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 332(Suppl2):52

Weber M, Lauer N, Noack E, Kojda G (1999). Hypertension is associated with decreased expression and activity of vascular soluble guanylate cyclase. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 332(Suppl2):52

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension: Role of peroxynitrite. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361(Suppl):R41

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Contribution of peroxynitrite to the pathophysiology of hypertension. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333(Suppl 1):21

Mülsch A, Weber M, Klös S, Behrens M, Lauer N, Kojda G (2000). The effect of peroxynitrite on the activity of soluble guanylyl cyclase. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 333(Suppl 2):25

Lauer N, Weber M, Kojda G (2000). Nitric Oxide reduces expression and activity of soluble guanylate cyclase in rat aorta. Presented at 2<sup>nd</sup> Symposium on Vascular Biology of the Interdisciplinary Center for Clinical Research, University Münster, Oct. 05-07,2000: P45

Mülsch A, Weber M, Klös S, Behrens M, Lauer N, Kojda G (2000). Impairment of soluble guanylyl cyclase by peroxynitrite. *Circulation* 102(18):II-:351

Girbig D, Goecke TW, Weber M, Kojda G (2001). The activity and expression of umbilical cord guanylyl cyclase in preeclampsia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363(Suppl):R188

Kober T, Weber M, Lauer N, Kojda G (2001). The effect of oxidant stress on the expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Bas.Res.Cardiol.*; 96:I28

Weber M, Cai H, Kojda G, Harrison DG (2002). Eine Cys101-Alanin Mutation erhöht die Superoxidbildung der bovinen endothelialen NO-Synthase. Presented at VIII. NO-Forum, Uniklinikum Frankfurt, Oct. 03-05, 2002

# *Danksagung*

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Georg Kojda am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf.

Herrn Privatdozent Dr. Georg Kojda gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses sowie dem Ermöglichen meines Auslandsaufenthaltes. Auch danke ich ihm für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. D. Höltje danke ich für die Verteidigung der vorliegenden Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn Professor Dr. Rüther danke ich für die gute Zusammenarbeit in der Etablierung der transgenen Tiere und für die Durchführung der Mikroinjektion.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. G. Harrison für die Möglichkeit in seinem Labor an der Emory University in Atlanta, GA, USA wissenschaftlich arbeiten zu können. Ich bedanke mich für die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge, sowie die einmalige Erfahrung in Amerika arbeiten und leben zu dürfen.

Ganz herzlichen Dank all denen, die während meiner Promotionszeit zur Freude bei der Laborarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Kollegin und Freundin Nadine Lauer, die mich durch viele Höhen und Tiefen begleitet hat. Ich bedanke mich für gute Zusammenarbeit mit den Doktoranden des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Verena Schmitz, Thorsten Kober, Daniel Girbig, Ute Laber und Alexander Zimmermann.

Ein großes Dankeschön für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit gebührt Herrn Prof. Dr. K. Schrör und allen Mitarbeitern sowie Doktoranden des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden, die mich seelisch unterstützt und zum Durchhalten motiviert haben.

# ***LEBENS LAUF***

---

Name: Weber  
Vorname: Martina  
Anschrift: Fridtjof-Nansen-Str. 3  
45131 Essen  
geboren am: 16.08.1972

## **Schulbildung**

1979-1983 Grundschohle in Essen  
1983-1992 Gymnasium in Essen

## **Studium**

1992-1997 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Studium der Pharmazie mit Abschluss  
1999 Approbation als Apothekerin

## **Praktikum**

1997-1998 Pharmaziepraktikum, Lindopharm GmbH, Hilden  
und Augusta-Apotheke, Düsseldorf

## **Promotion**

seit 1999 Promotion im Institut für Pharmakologie und klinische  
Pharmakologie der Medizinischen Einrichtungen der  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
2001 Auslandsaufenthalt im Rahmen der Promotion an der Emory  
University, Atlanta, GA, USA, im Labor von Prof. Dr. Harrison

Düsseldorf, 10. Oktober 2002